

ΑΡΙΣΤΕΙΑ Ι

ΕΡΓΟ: Λειτουργικές Αυτο-οργανούμενες Νανοδομές από Συμπολυμερή κατά Συστάδες και Πρωτεΐνες (NANOMACRO) 1129

ΕΝΟΤΗΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΕΕ3

**ΠΑΡΑΔΟΤΕΟ 3.1: Έκθεση αποτελεσμάτων
παρασκευής και χαρακτηρισμού 3D αυτο-οργανούμενων
υβριδικών νανοδομών από συμπολυμερή κατά συστάδες
και πρωτεΐνες σε διαλύματα**

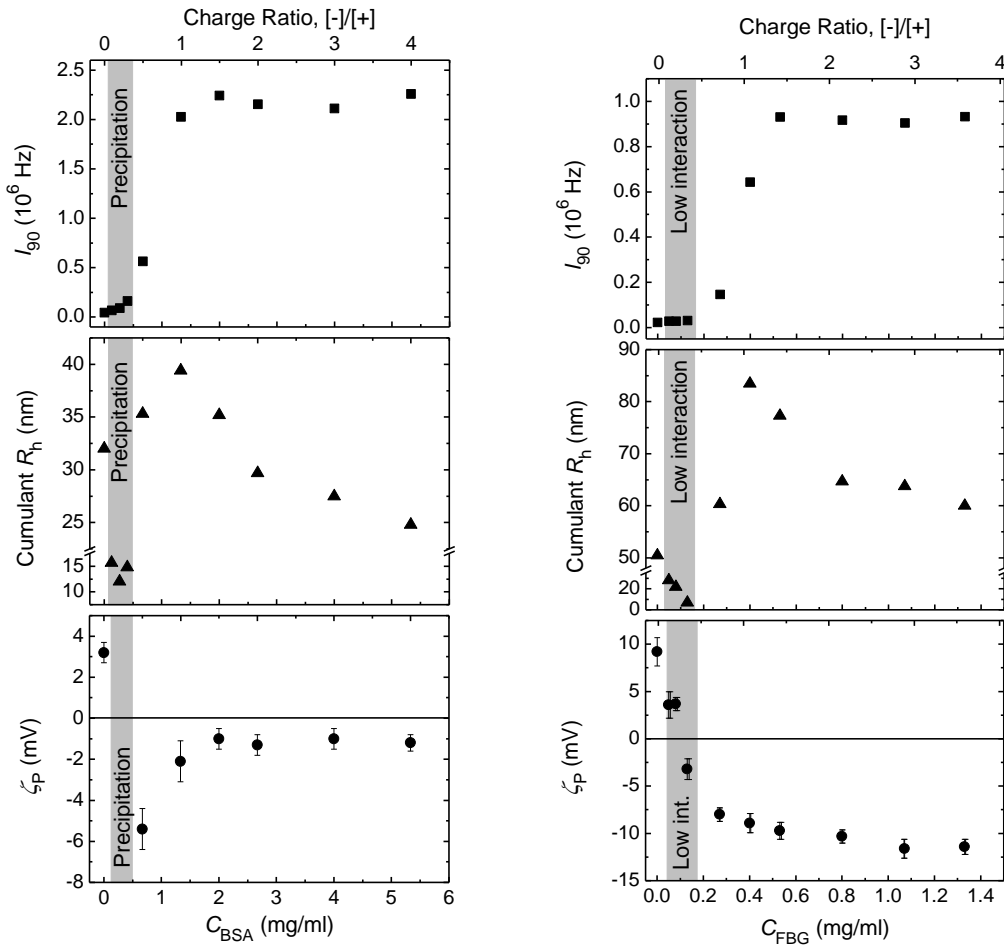


Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Στα πλαίσια του προγράμματος NANOMACRO πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη και μελέτη με διάφορες πειραματικές τεχνικές αυτοοργανούμενων υβριδικών νανοδομών σε διαλύματα με χρήση κάποιων από τα συμπολυμερή κατά συστάδες, των οποίων η αυτοοργάνωση μελετήθηκε στα πλαίσια του έργου, και πρωτεΐνες (3D νανοδομές) μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των συστατικών. Συγκεκριμένα:

1. Σφαιρικές, 3D, υβριδικές νανοδομές βασισμένες στο συμπολυμερές QNPHOS-PEO και τη σφαιρική πρωτεΐνη BSA (bovine serum albumin, αλβουμίνη ορού βοδιού) ή την κυλινδρικού σχήματος πρωτεΐνη FBG (fibrinogen, ινωδογόνο). Οι νανοδομές αυτές σχηματίζονται λόγω των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ της θετικά φορτισμένης πολυηλεκτρολυτικής συστάδας QNPHOS και των αρνητικά φορτισμένων επιφανειακών περιοχών του μορίου της BSA ή της FBG. Η διαδικασία της σύμπλεξης μεταξύ των δύο ειδών μακρομορίων μελετήθηκε σε pH 7 και ιοντική ισχύ 0.01 M, συναρτήσεως της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης BSA ή FBG στο διάλυμα, ή ισοδύναμα της αναλογίας φορτίων [-]/[+] (η οποία ορίζεται ως ο λόγος των συνολικών moles αρνητικών προς θετικών φορτίων των δύο συστατικών στο διάλυμα).

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις δυναμικής (DLS) και ηλεκτροφορητικής (ELS) σκέδασης φωτός και οι μετρούμενες τιμές της έντασης σκέδασης στις 90° , I_{90} , της υδροδυναμικής ακτίνας, R_h , (η οποία προκύπτει μέσω της ανάλυσης cumulant), καθώς και του ζήτα δυναμικού, ζ_p , παρουσιάζονται στο Σχήμα 1 συναρτήσεως της συγκέντρωσης της εκάστοτε πρωτεΐνης ή ισοδύναμα της αναλογίας φορτίων [-]/[+] για τα διαλύματα των συμπλόκων των συστημάτων QNPHOS-PEO/BSA και QNPHOS-PEO/FBG σε pH 7 και ιοντική ισχύ 0.01 M. Να σημειωθεί ότι στην περίπτωση των διαλυμάτων του συστήματος QNPHOS-PEO/BSA που έχουν εμφανίσει καθίζηση (precipitation) οι τιμές των I_{90} και R_h προέρχονται από τη μέτρηση του υπερκείμενου διαλύματος. Όπως φαίνεται και για τα δύο συστήματα, τόσο η συμπεριφορά σε διάλυμα των συμπλόκων, όσο και οι ιδιότητες τους αναφορικά με τη μάζα, το μέγεθος και το ενεργό φορτίο τους εξαρτώνται από τη συγκέντρωση της εκάστοτε πρωτεΐνης στο διάλυμα (ή ισοδύναμα από την αναλογία φορτίων [-]/[+]), δηλαδή την αναλογία των δύο συστατικών.

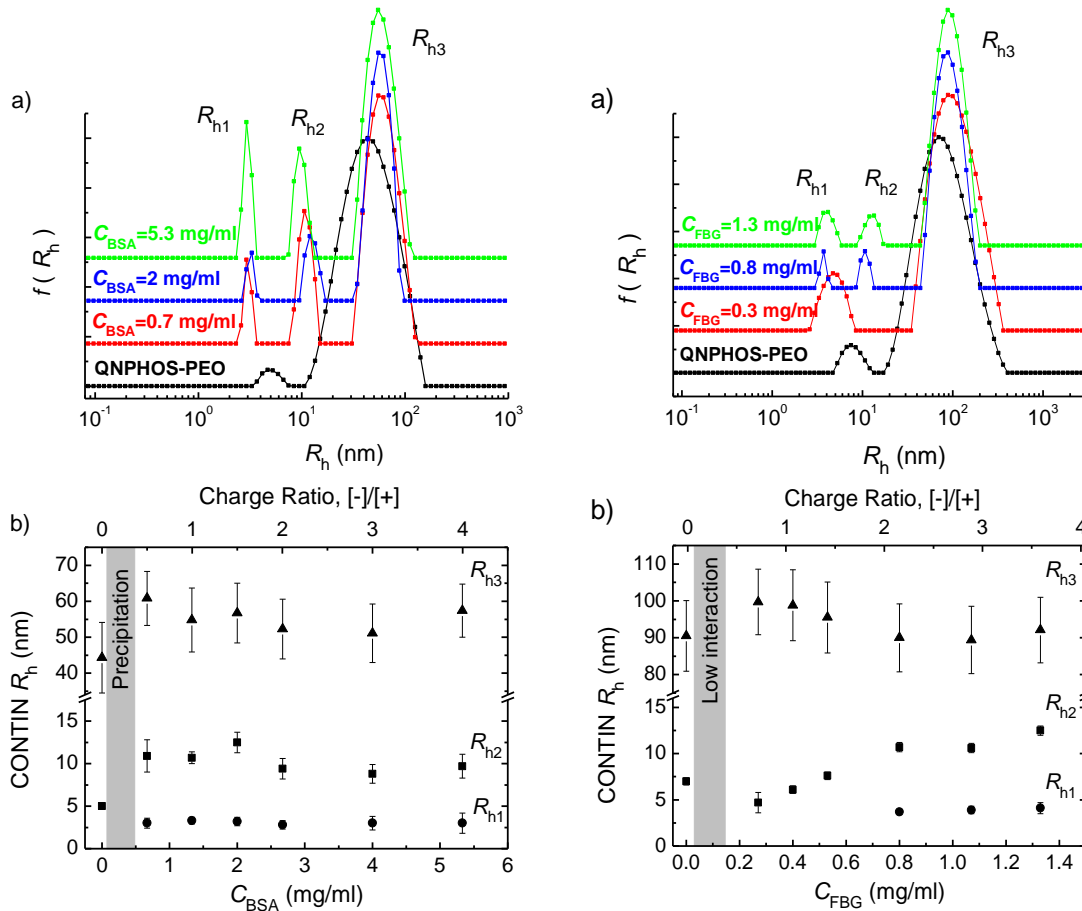


Σχήμα 1: Ένταση σκέδασης στις 90° , I_{90} , υδροδυναμική ακτίνα, R_h , (η οποία προκύπτει μέσω της ανάλυσης cumulant), καθώς και ζήτα δυναμικό, ζ_P , συναρτήσει της συγκέντρωσης της εκάστοτε πρωτεΐνης ή ισοδύναμα της αναλογίας φορτίων [-]/[+] για τα διαλύματα των συμπλόκων των συστημάτων QNPHOS-PEO/BSA (αριστερά) και QNPHOS-PEO/FBG (δεξιά) σε pH 7 και ιοντική ισχύ 0.01 M.

Περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τους διάφορους πληθυσμούς που συνυπάρχουν στα διαλύματα των συμπλόκων εξάγονται μέσω των κατανομών των υδροδυναμικών ακτίνων που προκύπτουν μέσω της ανάλυσης CONTIN. Στο Σχήμα 2 παρουσιάζονται οι κατανομές των υδροδυναμικών ακτίνων, R_h , για αντιπροσωπευτικές τιμές της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών (οι αντίστοιχες κατανομές του QNPHOS-PEO παρατίθενται επίσης για λόγους σύγκρισης), καθώς και οι αντίστοιχες τιμές των R_h για κάθε πληθυσμό συναρτήσει της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης (ή ισοδύναμα της αναλογίας φορτίων [-]/[+]), για τα διαλύματα των συμπλόκων των συστημάτων QNPHOS-PEO/BSA και QNPHOS-PEO/FBG σε pH 7 και ιοντική ισχύ 0.01 M.

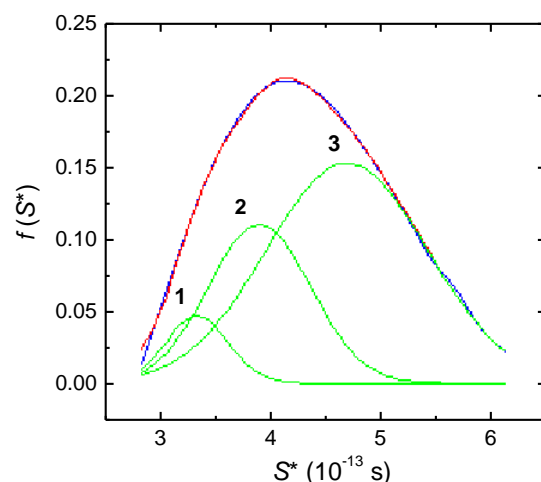
Είναι εμφανές ότι και στα δύο συστήματα παρατηρείται η ύπαρξη δύο διαφορετικών ειδών συμπλόκων (κορυφές R_{h2} και R_{h3}) τα οποία πιθανότατα σχηματίζονται λόγω της αλληλεπίδρασης μεταξύ των ελεύθερων μεμονωμένων αλυσίδων και των συσσωματωμάτων πολλαπλών αλυσίδων του συμπολυμερούς QNPHOS-PEO και των πρωτεϊνικών μορίων της BSA ή του FBG. Επιπροσθέτως, σε όλα τα διαλύματα του συστήματος QNPHOS-PEO/BSA, καθώς και στα διαλύματα του συστήματος QNPHOS-PEO/FBG με $C_{FBG} \geq 0.8$ mg/ml, διαπιστώνεται η ύπαρξη μίας κορυφής σε μικρότερες τιμές (R_{h1}) η οποία αποδίδεται στην ύπαρξη ελεύθερων πρωτεϊνικών μορίων, γεγονός που υποδηλώνει ότι η δυνατότητα

αλληλεπίδρασης του συμπολυμερούς QNPPOS-PEO με τα πρωτεϊνικά μόρια των BSA και FBG είναι κατά κάποιο βαθμό περιορισμένη.



Σχήμα 2: a) Κατανομές υδροδυναμικών ακτίνων, R_h , για αντιπροσωπευτικές τιμές της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών (οι αντίστοιχες κατανομές του QNPPOS-PEO περιλαμβάνονται για λόγους σύγκρισης) και b) οι αντίστοιχες τιμές R_h για κάθε πληθυσμό συναρτήσει της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών ή της αναλογίας φορτίων [-]/[+] (τα σφάλματα αντιπροσωπεύουν το ποσοστό της κάθε κορυφής), για τα διαλύματα των συμπλόκων των συστημάτων QNPPOS-PEO/BSA (αριστερά) και QNPPOS-PEO/FBG (δεξιά) σε pH 7 και ιοντική ισχύ 0.01 M.

Εν συνεχεία πραγματοποιήθηκαν συμπληρωματικές μετρήσεις αναλυτικής υπερφυγοκέντρωσης (AUC) και συγκεκριμένα πειράματα μέτρησης της ταχύτητας καθίζησης (Sedimentation Velocity, SV) για αντιπροσωπευτικά διαλύματα συμπλόκων των δύο συστημάτων. Η ληφθείσα κατανομή του φαινομένου συντελεστή καθίζησης, S^* , για ένα διάλυμα του συστήματος QNPPOS-PEO/BSA με $C_{BSA} = 1.3$ mg/ml σε pH 7 και ιοντική ισχύ 0.01 M παρουσιάζεται στο Σχήμα 3. Η καλύτερη προσαρμογή (fit) της καμπύλης της κατανομής επιτυγχάνεται μέσω των τριών κορυφών που αντιστοιχούν στις τιμές του συντελεστή καθίζησης που παρατίθενται στον Πίνακα 1, όπου επίσης περιλαμβάνονται οι αντίστοιχες τιμές του φαινομένου συντελεστή διάχυσης, D^* , καθώς και του ενεργού μοριακού βάρους, M , για κάθε κορυφή. Σαφέστατα, μέσω των μετρήσεων AUC-SV καθίσταται δυνατός ο διαχωρισμός τριών διαφορετικών πληθυσμών συμπλόκων, τα οποία αποτελούνται από διαφορετικό αριθμό αλυσίδων του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη και πρωτεϊνικών μορίων (όπως υποδηλώνουν οι τιμές του M). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι όσον αφορά την πολυδιασπορά του διαλύματος η τεχνική AUC παρέχει καλύτερη ανάλυση συγκριτικά με τις μετρήσεις σκέδασης φωτός.

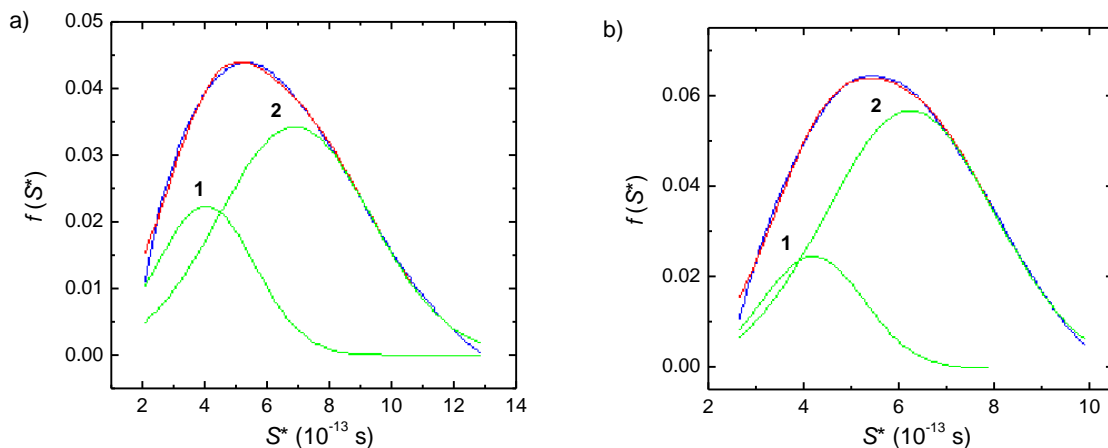


Σχήμα 3: Κατανομή του φαινόμενου συντελεστή καθίζησης, S^* , για ένα αντιπροσωπευτικό διάλυμα συμπλόκων του συστήματος QNPHOS-PEO/BSA με $C_{BSA} = 1.3$ mg/ml. Οι κορυφές 1, 2 και 3 είναι τα αποτελέσματα της καλύτερης προσαρμογής της καμπύλης.

Πίνακας 1: Αποτελέσματα της ανάλυσης της κατανομής του φαινόμενου συντελεστή καθίζησης, S^* , για ένα αντιπροσωπευτικό διάλυμα συμπλόκων του συστήματος QNPHOS-PEO/BSA με $C_{BSA} = 1.3$ mg/ml.

| Κορυφή | S^* (10^{-13} s) | D^* (10^{-8} cm ² s ⁻¹) | M (10^5 g mol ⁻¹) |
|--------|--------------------------|--|---------------------------------------|
| 1 | 3.3 | 1.9 | 15.8 |
| 2 | 3.9 | 5.1 | 6.9 |
| 3 | 4.7 | 12.5 | 3.4 |

Αντίστοιχες μετρήσεις AUC-SV πραγματοποιήθηκαν και για ένα διάλυμα συμπλόκων του συστήματος QNPHOS-PEO/FBG με $C_{FBG} = 0.8$ mg/ml σε pH 7 και ιοντική ισχύ 0.01 M. Κατά τη μέτρηση αυτή παρατηρήθηκε διαφορετική ταχύτητα διάδοσης του ορίου της καθίζησης (sedimentation boundary) κατά το σύνολο των σαρώσεων (scans) και για το λόγο αυτό η ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε ξεχωριστά για τις πρώτες 16 και τις τελευταίες 16 σαρώσεις. Οι ληφθείσες κατανομές του φαινόμενου συντελεστή καθίζησης, S^* , παρουσιάζονται στο Σχήμα 4, ενώ τα αντίστοιχα αποτελέσματα της ανάλυσης των κατανομών παρατίθενται στον Πίνακα 2. Όπως και στην προηγούμενη περίπτωση του συστήματος QNPHOS-PEO/BSA, καθίσταται δυνατή η διάκριση τουλάχιστον τριών διαφορετικών πληθυσμών συμπλόκων, αναφορικά με τον αριθμό αλυσίδων του δυσσταδικού πολυηλεκτρολύτη και πρωτεϊνικών μορίων που εμπεριέχουν. Επομένως, η αυξημένη διακριτική ικανότητα των μετρήσεων AUC-SV επαληθεύεται και σε αυτή την περίπτωση.

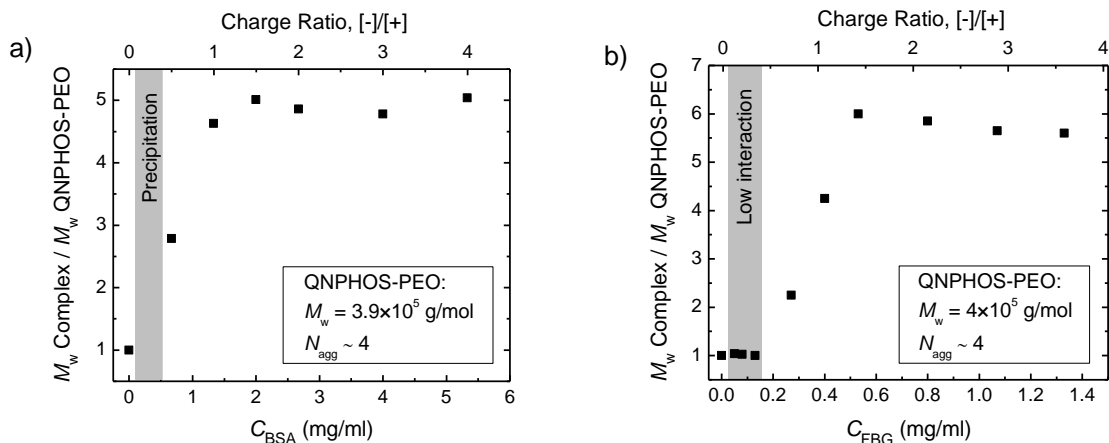


Σχήμα 4: Κατανομές του φαινομένου συντελεστή καθίζησης, S^* , που προκύπτουν από την ανάλυση των α) πρώτων 16 και β) τελευταίων 16 σαρώσεων της μέτρησης AUC-SV ενός αντιπροσωπευτικού διαλύματος συμπλόκων του συστήματος QNPHOS-PEO/FBG με $C_{\text{FBG}} = 0.8$ mg/ml. Οι κορυφές 1 και 2 και στις δύο περιπτώσεις είναι τα αποτελέσματα της καλύτερης προσαρμογής της καμπύλης.

Πίνακας 2: Αποτελέσματα της ανάλυσης των κατανομών του φαινομένου συντελεστή καθίζησης, S^* , για ένα αντιπροσωπευτικό διάλυμα συμπλόκων του συστήματος QNPHOS-PEO/FBG με $C_{\text{FBG}} = 0.8$ mg/ml.

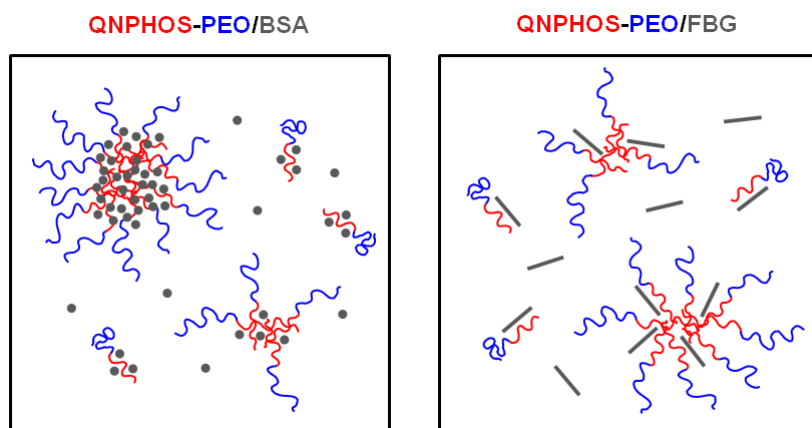
| Σαρώσεις | Κορυφή | S^* (10^{-13} s) | D^* (10^{-8} cm ² s ⁻¹) | M (10^5 g mol ⁻¹) |
|---------------|--------|--------------------------|--|---------------------------------------|
| Πρώτες 16 | 1 | 4.1 | 2.4 | 15.6 |
| | 2 | 6.9 | 5.8 | 10.9 |
| Τελευταίες 16 | 1 | 4.2 | 3.9 | 9.6 |
| | 2 | 6.2 | 10.6 | 5.3 |

Επιπλέον πληροφορίες σχετικά με τη δομή των συμπλόκων δύναται να εξαχθούν μέσω των τιμών του φαινομένου μοριακού βάρους, M_w , που εξάγονται από αντίστοιχες μετρήσεις στατικής σκέδασης φωτός (SLS). Στο Σχήμα 5 παρουσιάζονται οι τιμές του M_w συναρτήσει της συγκέντρωσης της κάθε πρωτεΐνης (ή της αναλογίας φορτίων [-]/[+]) για τα διαλύματα των συμπλόκων των συστημάτων QNPHOS-PEO/BSA και QNPHOS-PEO/FBG σε pH 7 και ιοντική ισχύ 0.01 M, κανονικοποιημένες ως προς την τιμή του M_w του αντίστοιχου διαλύματος (ως προς τη συγκέντρωση) του δισυσταδικού πολυηλεκτρολύτη QNPHOS-PEO, οι οποίες παρατίθενται στα ένθετα.



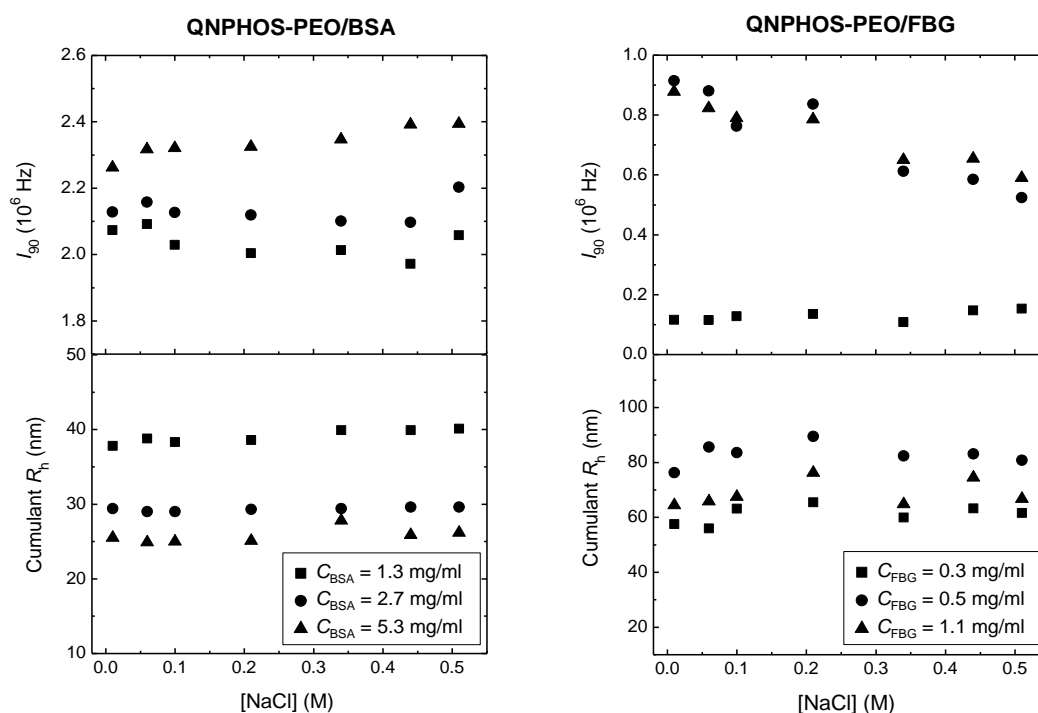
Σχήμα 5: Κανονικοποιημένο φαινόμενο μοριακό βάρος, M_w , συναρτήσει της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης (ή της αναλογίας φορτίων [-]/[+]) για τα διαλύματα των συμπλόκων των συστημάτων a) QNPHOS-PEO/BSA και b) QNPHOS-PEO/FBG σε pH 7 και ιοντική ισχύ 0.01 M.

Συγκρίνοντας τις μετρούμενες τιμές του M_w για τα διαλύματα των συμπλόκων με τις αντίστοιχες τιμές του διαλύματος του QNPHOS-PEO και τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών BSA και FBG, λαμβάνοντας πάντα υπόψη τη μοριακή αναλογία των δύο συστατικών, μπορεί να υπολογιστεί ο αριθμός των συσσωματωμάτων αλυσίδων του συμπολυμερούς QNPHOS-PEO και των πρωτεϊνικών μορίων που περιλαμβάνουν τα σύμπλοκα. Με τον τρόπο αυτό υπολογίζεται ότι για το σύστημα QNPHOS-PEO/BSA οι τιμές του M_w του τελικού πλατό αντιστοιχούν σε περίπου 3 συσσωματώματα αλυσίδων και 10 με 12 μόρια BSA. Η αντίστοιχη αναλογία για το σύστημα QNPHOS-PEO/FBG είναι περί τα 2 συσσωματώματα αλυσίδων και περί τα 4 πρωτεϊνικά μόρια (και πάλι για τις τιμές του τελικού πλατό). Επομένως εξάγεται το συμπέρασμα ότι και για τα δύο συστήματα οι μεγαλύτεροι σε μέγεθος πληθυσμοί είναι δευτερογενή συσσωματώματα των αρχικών συσσωματωμάτων πολλαπλών αλυσίδων του QNPHOS-PEO που έχουν συμπλεχθεί με τα μόρια των BSA ή FBG. Εκτός αυτών στο διάλυμα υπάρχουν επίσης: ένα ποσοστό μονών συσσωματωμάτων πολλαπλών αλυσίδων του QNPHOS-PEO συμπλεγμένων με πρωτεϊνικά μόρια, τα σύμπλοκα που σχηματίζονται μεταξύ των ελεύθερων δισυσταδικών πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων και των πρωτεϊνών, καθώς και ελεύθερα πρωτεϊνικά μόρια, όπως κατέδειξαν οι προηγούμενες μετρήσεις DLS και AUC. Μία σχηματική αναπαράσταση των διαφόρων πληθυσμών που συνυπάρχουν στα διαλύματα των συμπλόκων των συστημάτων QNPHOS-PEO/BSA και QNPHOS-PEO/FBG σε pH 7 και ιοντική ισχύ 0.01 M παρουσιάζεται στο Σχήμα 6.



Σχήμα 6: Αναπαράσταση της δομής των συμπλόκων για τα διαλύματα των συστημάτων QNPHOS-PEO/BSA (αριστερά) και QNPHOS-PEO/FBG (δεξιά) σε pH 7 και ιοντική ισχύ 0.01 M.

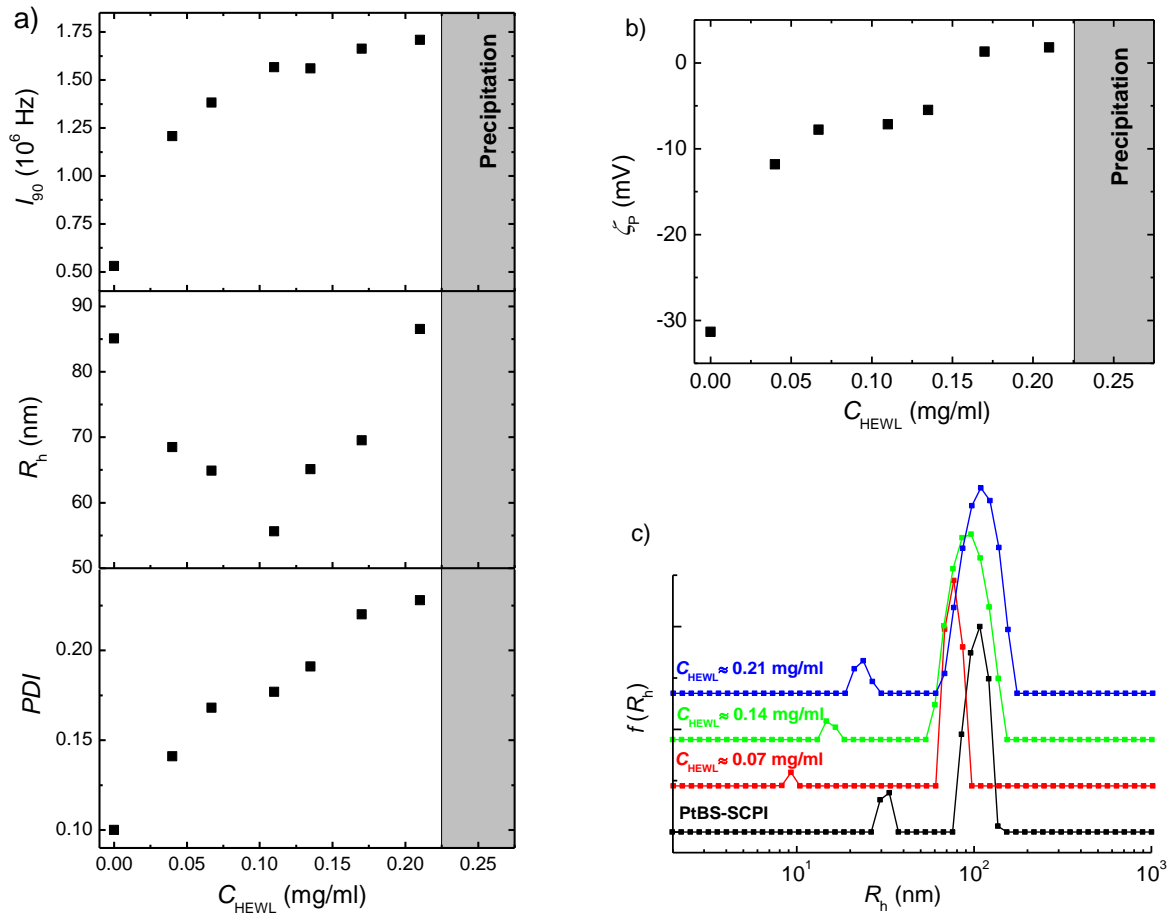
Τέλος, διερευνήθηκε η σταθερότητα των ήδη σχηματισμένων συμπλόκων έναντι της ιοντικής ισχύος και διαπιστώθηκε ότι τα σύμπλοκα του συστήματος QNPHOS-PEO/BSA, καθώς και τα αντίστοιχα σύμπλοκα του συστήματος QNPHOS-PEO/FBG που σχηματίζονται στην περιοχή των χαμηλών τιμών της C_{FBG} παρέμειναν πρακτικά ανεπηρέαστα κατά την αύξηση της ιοντικής ισχύος του διαλύματος από 0.01 σε 0.5 M. Αντίθετα, για τα σύμπλοκα του συστήματος QNPHOS-PEO/FBG που σχηματίζονται στην περιοχή των υψηλών τιμών της C_{FBG} η αύξηση της ιοντικής ισχύος του διαλύματος οδήγησε σε μερική αποσυμπλοκοποίηση, γεγονός που συνεπάγεται ότι η δομή των συγκεκριμένων συμπλόκων δεν είναι τόσο σταθερή. Οι τιμές των I_{90} και R_h συναρτήσει της ιοντικής ισχύος του διαλύματος για αντιπροσωπευτικά διαλύματα συμπλόκων των συστημάτων QNPHOS-PEO/BSA και QNPHOS-PEO/FBG σε pH 7 παρουσιάζονται στο Σχήμα 7.



Σχήμα 7: Ένταση σκέδασης στις 90°, I_{90} , και υδροδυναμική ακτίνα, R_h , (η οποία προκύπτει μέσω της ανάλυσης cumulant), συναρτήσει της ιοντικής ισχύος για αντιπροσωπευτικά διαλύματα συμπλόκων των συστημάτων QNPHOS-PEO/BSA (αριστερά) και QNPHOS-PEO/FBG (δεξιά) σε pH 7.

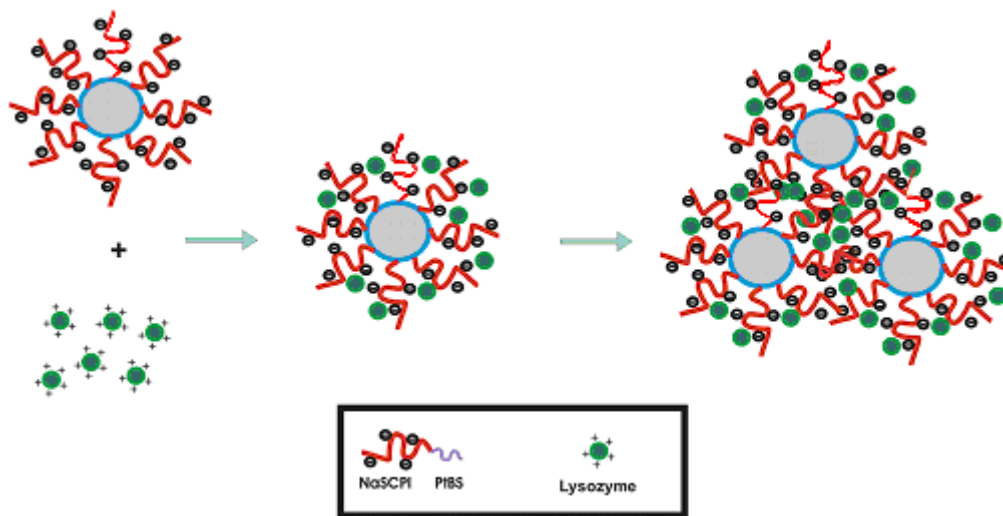
2. Σφαιρικές, υβριδικές νανοδομές που προκύπτουν μέσω των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πολυηλεκτρολυτικών μικκυλίων που σχηματίζει το δισυσταδικό συμπολυμερές PtBS-SCPI και της πρωτεΐνης HEWL (hen egg white lysozyme, λυσοζύμη από ασπράδι αυγού κότας). Συγκεκριμένα οι αρνητικά φορτισμένες αλυσίδες SCPI της κορώνας των μικκυλίων αλληλεπιδρούν με τις θετικά φορτισμένες επιφανειακές περιοχές του μορίου της πρωτεΐνης HEWL. Η διαδικασία της σύμπλεξης μεταξύ των δύο μακρομορίων μελετήθηκε σε υδατικά διαλύματα με pH 7 και ιοντική ισχύ 0.01 M, συναρτήσει της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης HEWL στο διάλυμα.

Μέσω μετρήσεων DLS, SLS και ELS διαπιστώθηκε ότι η μάζα, το μέγεθος, το ενεργό φορτίο, η δομή και η διαλυτότητα των σχηματιζόμενων συμπλόκων εξαρτώνται από τη συγκέντρωση της HEWL στο διάλυμα (ή ισοδύναμα από την αναλογία των δύο συστατικών). Στο Σχήμα 8 παρουσιάζονται οι μετρούμενες τιμές της έντασης σκέδασης στις 90° , I_{90} , της υδροδυναμικής ακτίνας, R_h , (η οποία προκύπτει μέσω της ανάλυσης cumulant), του δείκτη πολυδιασποράς, PDI , και του ζήτα δυναμικού, ζ_p , συναρτήσει της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης για τα διαλύματα των συμπλόκων του συστήματος PtBS-SCPI/HEWL σε pH 7 και ιοντική ισχύ 0.01 M, καθώς και οι κατανομές των υδροδυναμικών ακτίνων, R_h , (οι οποίες εξάγονται μέσω της ανάλυσης CONTIN) για αντιπροσωπευτικές τιμές της C_{HEWL} (η αντίστοιχη κατανομή του PtBS-SCPI παρατίθενται επίσης για λόγους σύγκρισης).



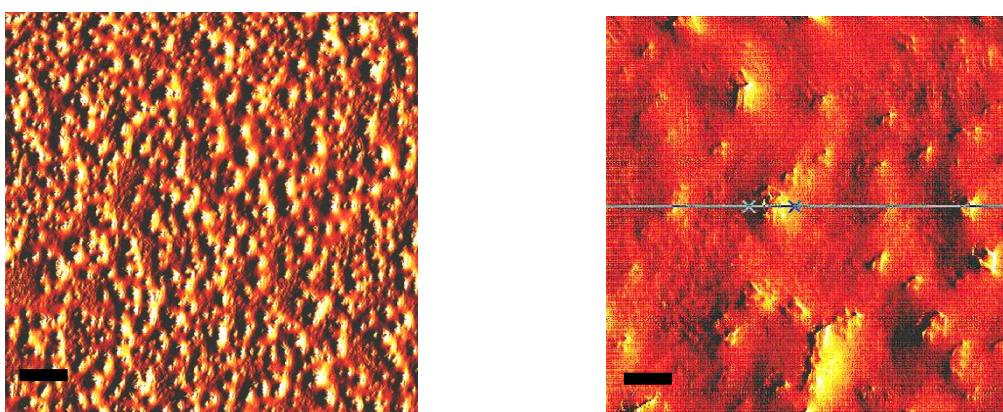
Σχήμα 8: α) Ένταση σκέδασης στις 90° , I_{90} , υδροδυναμική ακτίνα, R_h , (η οποία προκύπτει μέσω της ανάλυσης cumulant), δείκτης πολυδιασποράς, PDI , καθώς και β) ζήτα δυναμικό, ζ_p , συναρτήσει της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης για τα διαλύματα των συμπλόκων του συστήματος PtBS-SCPI/HEWL σε pH 7 και ιοντική ισχύ 0.01 M. γ) Κατανομές υδροδυναμικών ακτίνων, R_h , για αντιπροσωπευτικές τιμές της C_{HEWL} (η αντίστοιχη κατανομή του PtBS-SCPI παρατίθενται επίσης για λόγους σύγκρισης).

Με βάση τα αποτελέσματα αυτά συμπεραίνουμε ότι κατά την προσθήκη της HEWL στο διάλυμα του PtBS-SCPI, τα μόρια της πρωτεΐνης αλληλεπιδρούν με τις πολυηλεκτρολυτικές αλυσίδες της κορώνας των μικκυλίων προκαλώντας τη συρρίκνωση τους λόγω της εξουδετέρωσης των φορτίων. Η συρρίκνωση αυτή επιφέρει την παρατηρούμενη μείωση του μεγέθους των συμπλόκων. Καθώς η συγκέντρωση της πρωτεΐνης αυξάνεται και κάθε πολυηλεκτρολυτική αλυσίδα SCPI αλληλεπιδρά με περισσότερα μόρια HEWL η διαλυτότητα των σχηματιζόμενων συμπλόκων μειώνεται, λόγω της εξουδετέρωσης των φορτίων, με αποτέλεσμα τη δευτερογενή συσσωμάτωσή τους, η οποία γίνεται όλο και πιο έντονη και τελικά καταλήγει στην καθίζηση των συμπλόκων και το διφασικό διαχωρισμό του διαλύματος (precipitation). Μία σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας της σύμπλεξης παρουσιάζεται στο Σχήμα 9.



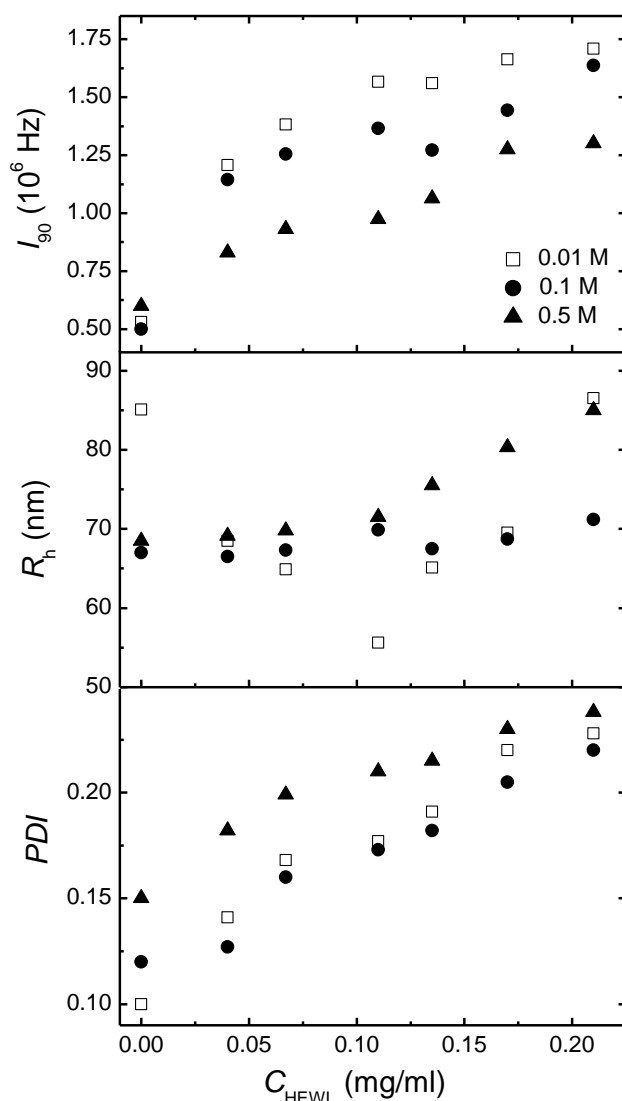
Σχήμα 9: Αναπαράσταση της διαδικασίας σύμπλεξης συναρτήσει της αύξησης της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης για το σύστημα PtBS-SCPI/HEWL σε pH 7 και ιοντική ισχύ 0.01 M.

Επιπρόσθετες μετρήσεις μικροσκοπίας ατομικής δύναμης (Atomic Force Microscopy, AFM) επιβεβαίωσαν τη σφαιρική δομή των συμπλόκων. Στο Σχήμα 10 παρουσιάζονται δύο εικόνες AFM διαφορετικής ανάλυσης των συμπλόκων του συστήματος PtBS-SCPI/HEWL που σχηματίζονται για $C_{HEWL} = 0.17$ mg/ml σε pH 7 και ιοντική ισχύ 0.01 M, μετά την εναπόθεσή τους σε επιφάνεια πυριτίου και την εξάτμιση του διαλύτη.



Σχήμα 10: Εικόνες AFM διαφορετικής ανάλυσης των συμπλόκων του συστήματος PtBS-SCPI/HEWL που σχηματίζονται για $C_{HEWL} = 0.17$ mg/ml σε pH 7 και ιοντική ισχύ 0.01 M. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν 1 μ m (αριστερά) και 200 nm (δεξιά), αντίστοιχα.

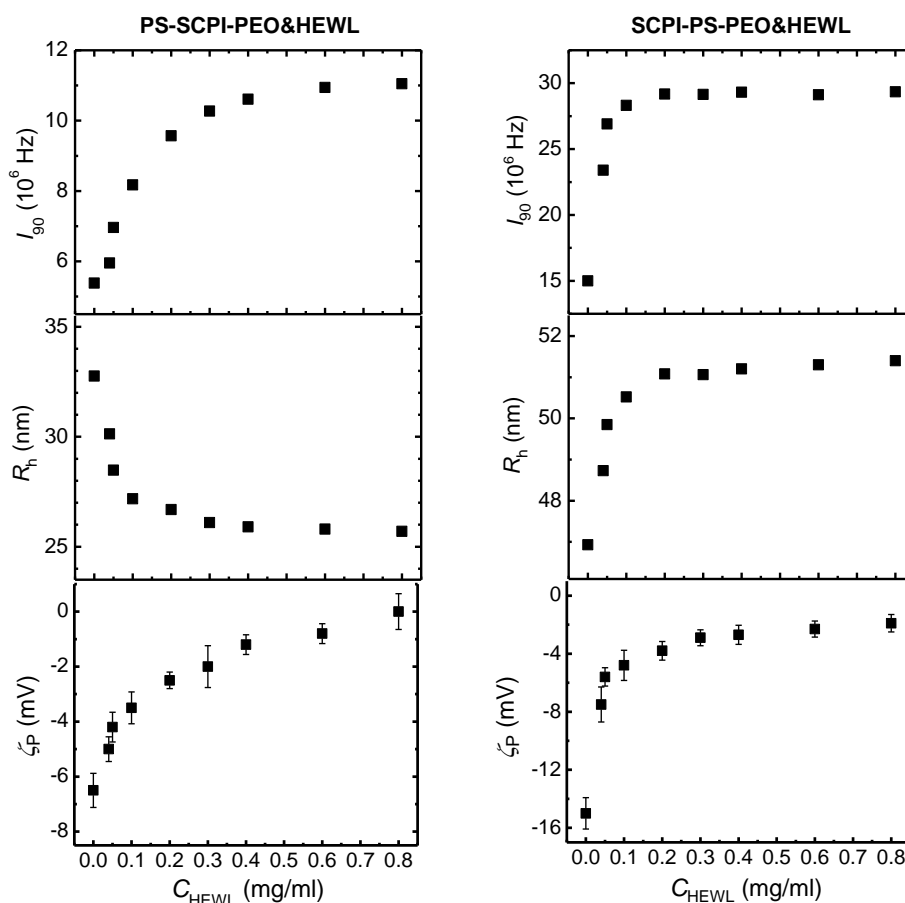
Τέλος, διερευνήθηκε μέσω μετρήσεων DLS η επίδραση της αύξησης της ιοντικής ισχύος του διαλύματος από 0.01 M σε 0.1 και 0.5 M στα ήδη σχηματισμένα σύμπλοκα. Οι μετρούμενες τιμές των I_{90} , R_h , και PDI για τα διαλύματα των συμπλόκων του συστήματος PtBS-SCPI/HEWL σε pH 7 και 0.1 ή 0.5 M ιοντική ισχύ παρουσιάζονται συναρτήσει της C_{HEWL} στο Σχήμα 11, όπου επίσης παρατίθενται οι αντίστοιχες τιμές σε ιοντική ισχύ 0.01 M για λόγους σύγκρισης. Η παρατηρούμενη μείωση της μάζας (ανάλογη του I_{90}) των συμπλόκων συνεπάγεται ότι η αύξηση της ιοντικής ισχύος του διαλύματος επιφέρει κάποιου βαθμού αποσυμπλοκοποίηση. Παράλληλα, διαπιστώνεται ότι το μέγεθος τους εξαρτάται τόσο από την ιοντική ισχύ του διαλύματος όσο και από την αναλογία των δύο συστατικών. Γενικά, εξάγεται το συμπέρασμα ότι η αναλογία των δύο συστατικών και η ιοντική ισχύς του διαλύματος μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δύο ανεξάρτητοι παράγοντες ελέγχου της δομής των συμπλόκων.



Σχήμα 11: Ένταση σκέδασης στις 90° , I_{90} , υδροδυναμική ακτίνα, R_h , (η οποία προκύπτει μέσω της ανάλυσης cumulant), καθώς και δείκτης πολυδιασποράς, PDI , συναρτήσει της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης για τα διαλύματα των συμπλόκων του συστήματος PtBS-SCPI/HEWL σε pH 7 και ιοντική ισχύ 0.01, 0.1 και 0.5 M.

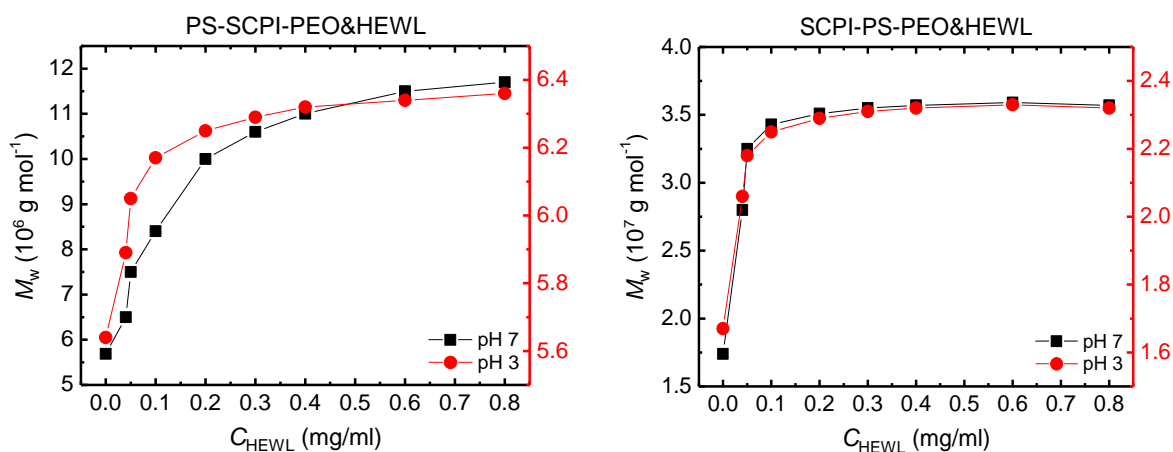
3. Σφαιρικές, υβριδικές νανοδομές οι οποίες προκύπτουν λόγω των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πολυηλεκτρολυτικών μικκυλίων που σχηματίζουν τα τρισυσταδικά συμπολυμερή PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO και της πρωτεΐνης HEWL. Συγκεκριμένα οι αρνητικά φορτισμένες αλυσίδες της συστάδας SCPI στην κορώνα, διαφορετικής διαμόρφωσης, των δύο ειδών μικκυλίων αλληλεπιδρούν με τις θετικά φορτισμένες επιφανειακές περιοχές του μορίου της πρωτεΐνης HEWL. Η διαδικασία της σύμπλεξης μελετήθηκε σε υδατικά διαλύματα με pH 7 ή pH 3 και ιοντική ισχύ 0.01 M, συναρτήσει της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης στο διάλυμα, ή ισοδύναμα της αναλογίας των δύο συστατικών.

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις DLS και ELS και οι μετρούμενες τιμές της έντασης σκέδασης στις 90° , I_{90} , της υδροδυναμικής ακτίνας, R_h , (η οποία προκύπτει μέσω της ανάλυσης cumulant) και του ζήτα δυναμικού, ζ_P , συναρτήσει της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης για τα διαλύματα των συμπλόκων των συστημάτων PS-SCPI-PEO&HEWL και SCPI-PS-PEO&HEWL σε pH 7 και ιοντική ισχύ 0.01 M παρουσιάζονται στο Σχήμα 12. Όπως διαπιστώνεται η μάζα, το μέγεθος και το ενεργό φορτίο των σχηματιζόμενων συμπλόκων εξαρτώνται από τη συγκέντρωση της HEWL στο διάλυμα (ή ισοδύναμα από την αναλογία των δύο συστατικών). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα σύμπλοκα διατηρούν τη διαλυτότητά τους σε όλο το μελετώμενο εύρος τιμών της C_{HEWL} , πιθανότητα λόγω της παρουσίας των αλυσίδων του PEO. Αντίστοιχη συμπεριφορά παρατηρήθηκε και για τα σύμπλοκα των δύο συστημάτων που σχηματίζονται σε pH 3 και ιοντική ισχύ 0.01 M.



Σχήμα 12: Ένταση σκέδασης στις 90° , I_{90} , υδροδυναμική ακτίνα, R_h , (η οποία προκύπτει μέσω της ανάλυσης cumulant) και ζήτα δυναμικό, ζ_P , συναρτήσει της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης για τα διαλύματα των συμπλόκων των συστημάτων PS-SCPI-PEO&HEWL (αριστερά) και SCPI-PS-PEO&HEWL (δεξιά) σε pH 7 και ιοντική ισχύ 0.01 M.

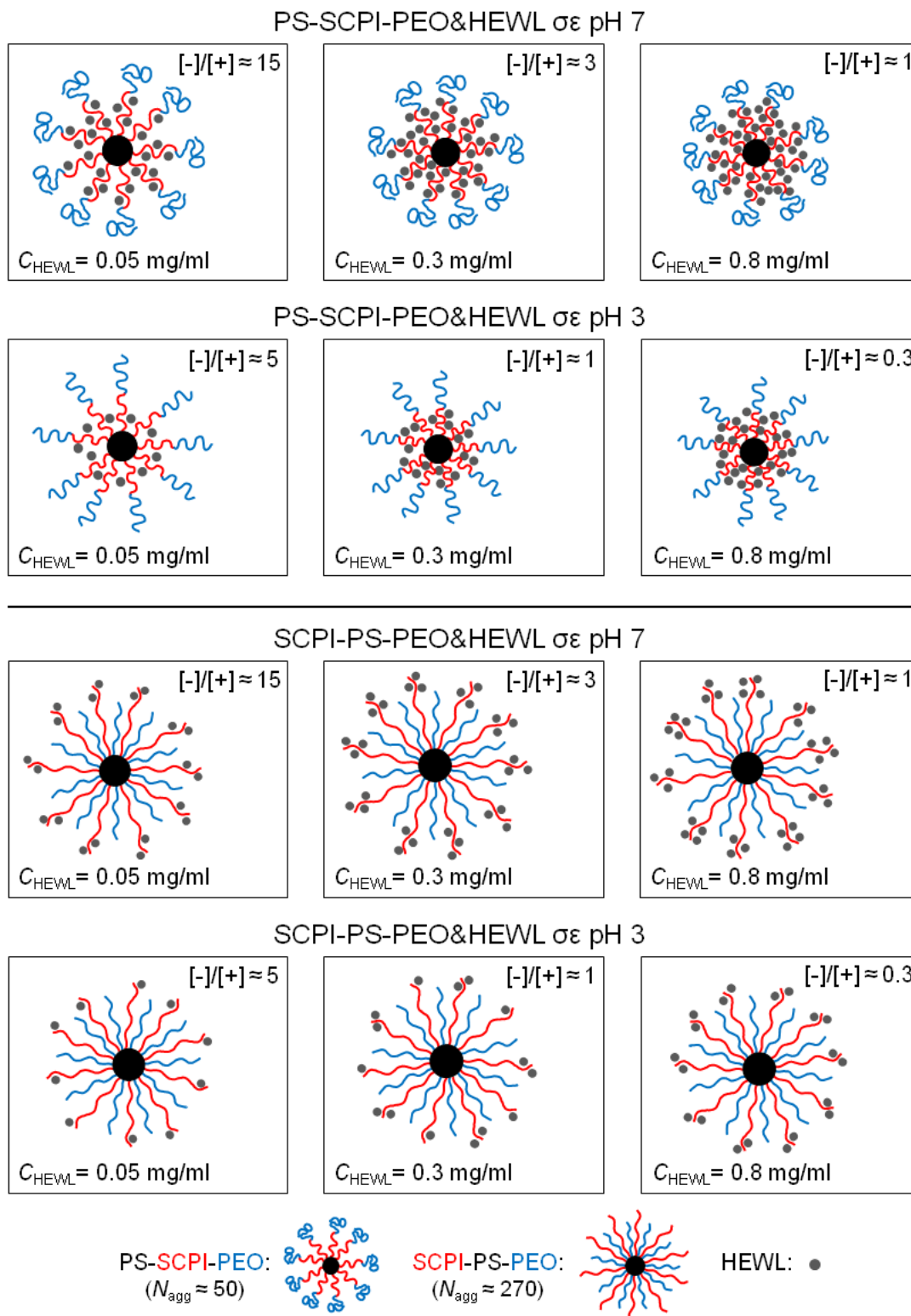
Με σκοπό την εξαγωγή περισσότερων πληροφοριών σχετικά με τη δομή των σχηματιζόμενων συμπλόκων πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις SLS ώστε να διερευνηθούν οι τιμές του μοριακού βάρους, M_w , των διαλυμάτων των συμπλόκων. Στο Σχήμα 13 παρουσιάζονται οι ληφθείσες τιμές του M_w συναρτήσει της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης για τα διαλύματα των συμπλόκων των συστημάτων PS-SCPI-PEO&HEWL και SCPI-PS-PEO&HEWL σε pH 7 ή 3 και ιοντική ισχύ 0.01 M.



Σχήμα 13: Φαινόμενο μοριακό βάρος, M_w , συναρτήσει της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης για τα διαλύματα των συμπλόκων των συστημάτων PS-SCPI-PEO&HEWL (αριστερά) και SCPI-PS-PEO&HEWL (δεξιά) σε pH 7 (αριστερός άξονας y) ή 3 (δεξιός άξονας y) και ιοντική ισχύ 0.01 M.

Μέσω της σύγκρισης των μετρούμενων τιμών του M_w για τα διαλύματα των συμπλόκων και των αντίστοιχων τιμών των διαλυμάτων των PS-SCPI-PEO και SCPI-PS-PEO, καθώς και του μοριακού βάρους της HEWL, λαμβάνοντας πάντα υπόψη τη μοριακή αναλογία των δύο συστατικών, εξάγεται ο αριθμός των μικκυλίων και των πρωτεϊνικών μορίων που απαρτίζουν τα σύμπλοκα. Με τον τρόπο αυτό, εξάγεται η σχηματική αναπαράσταση της δομής των συμπλόκων που παρουσιάζεται στο Σχήμα 14.

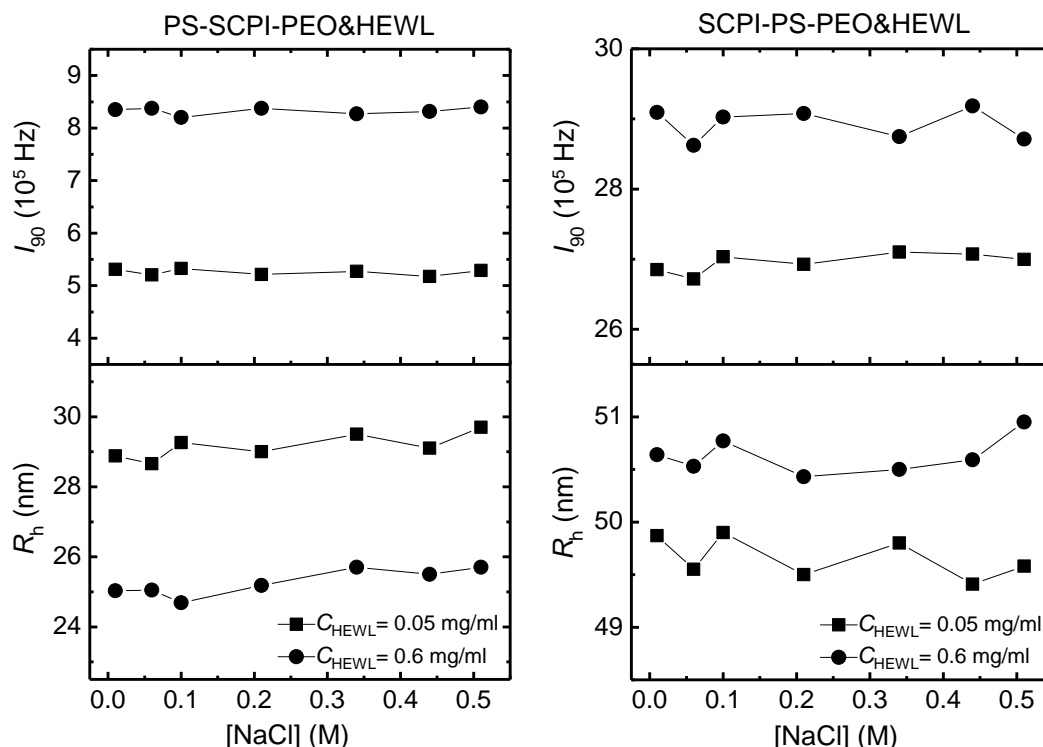
Όπως φαίνεται, για το σύστημα του PS-SCPI-PEO και της HEWL, η σύμπλεξη με τα μόρια της λυσοζύμης και στις δύο τιμές του pH, συνεπάγεται την εξουδετέρωση των φορτίων των πολυηλεκτρολυτικών συστάδων του SCPI του εσωτερικού στρώματος της κορώνας. Επομένως, επιφέρει τη συρρίκνωσή τους και κατ' επέκταση τη σταδιακή μείωση του μεγέθους των συμπλεγμένων μικκυλίων, καθώς αυξάνεται ο αριθμός των συμπλεγμένων πρωτεϊνικών μορίων συναρτήσει της συγκέντρωσης της λυσοζύμης. Στην αντίστοιχη περίπτωση του συστήματος του SCPI-PS-PEO και της HEWL, ο ιδιαίτερα υψηλός αριθμός συσσωμάτωσης των μικκυλίων ($N_{agg} \approx 270$), καθιστά αδύνατη την εισχώρηση των πρωτεϊνικών μορίων στο εσωτερικό της κορώνας, λόγω της συμπαγούς δομής της, οπότε η σύμπλεξη περιορίζεται στην εξωτερική περιφέρεια των μικκυλίων. Άλλωστε, το μεγαλύτερο μήκος των αλυσίδων του SCPI (συγκριτικά με αυτές του PEO) ενισχύει την περιφερειακή σύμπλεξη των μορίων της λυσοζύμης, ο αριθμός των οποίων και σε αυτή την περίπτωση αυξάνεται όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της HEWL. Η σύμπλεξη αποδείχθηκε εντονότερη σε pH 7 και για τα δύο συστήματα, εξαιτίας της μεγαλύτερης πυκνότητας φορτίου των πολυηλεκτρολυτικών συστάδων του SCPI. Τέλος, ο συνολικός αριθμός συμπλεγμένων μορίων λυσοζύμης ανά μικκύλιο είναι μεγαλύτερος για το σύστημα του SCPI-PS-PEO, παρόλο που κάθε πολυηλεκτρολυτική αλυσίδα αλληλεπιδρά με λιγότερα πρωτεϊνικά μόρια, καθώς τα συγκεκριμένα μικκύλια χαρακτηρίζονται από υψηλότερο αριθμό συσσωμάτωσης.



Σχήμα 14: Αναπαράσταση της δομής των συμπλόκων συναρτήσει της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης (ή ισοδύναμα της αναλογίας φορτίων $[-]/[+]$) για τα διαλύματα των συμπλόκων των συστημάτων PS-SCPI-PEO&HEWL (επάνω) και SCPI-PS-PEO&HEWL (κάτω) σε pH 7 ή 3 και ιοντική ισχύ 0.01 M.

Επιπροσθέτως, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις DLS συναρτήσει της ιοντικής ισχύος του διαλύματος ώστε να εξακριβωθεί η σταθερότητα των ήδη σχηματισμένων συμπλόκων. Οι τιμές των I_{90} και R_h συναρτήσει της ιοντικής ισχύος του διαλύματος για αντιπροσωπευτικά διαλύματα συμπλόκων με $C_{HEWL} = 0.05$ και 0.6 mg/ml των συστημάτων PS-SCPI-

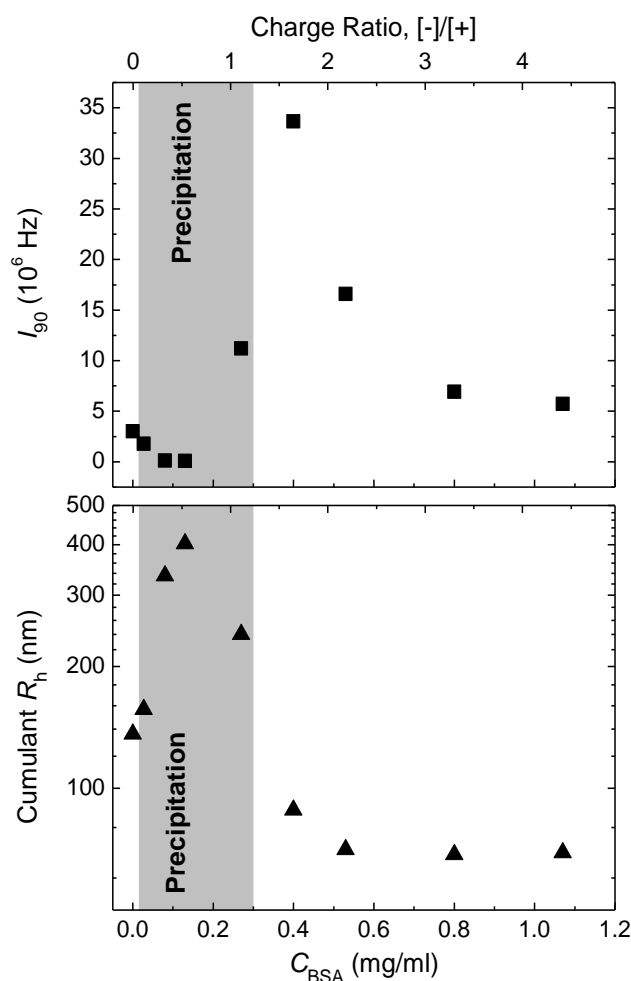
PEO&HEWL και SCPI-PS-PEO&HEWL σε pH 7 παρατίθενται στο Σχήμα 15. Η παρατηρούμενη σταθερότητα της μάζας και του μεγέθους των συμπλόκων και των δύο συστημάτων κατά την αύξηση της ιοντικής ισχύος του διαλύματος επιβεβαιώνει τη σταθερότητά τους, η οποία οφείλεται κυρίως στην παρουσία των αλυσίδων του PEO. Η ίδια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και σε pH 3.



Σχήμα 15: Ένταση σκέδασης στις 90° , I_{90} , και υδροδυναμική ακτίνα, R_h , (η οποία προκύπτει μέσω της ανάλυσης cumulant), συναρτήσεως της ιοντικής ισχύος για αντιπροσωπευτικά διαλύματα συμπλόκων με $C_{HEWL} = 0.05$ και 0.6 mg/ml των συστημάτων PS-SCPI-PEO&HEWL (αριστερά) και SCPI-PS-PEO&HEWL (δεξιά) σε pH 7.

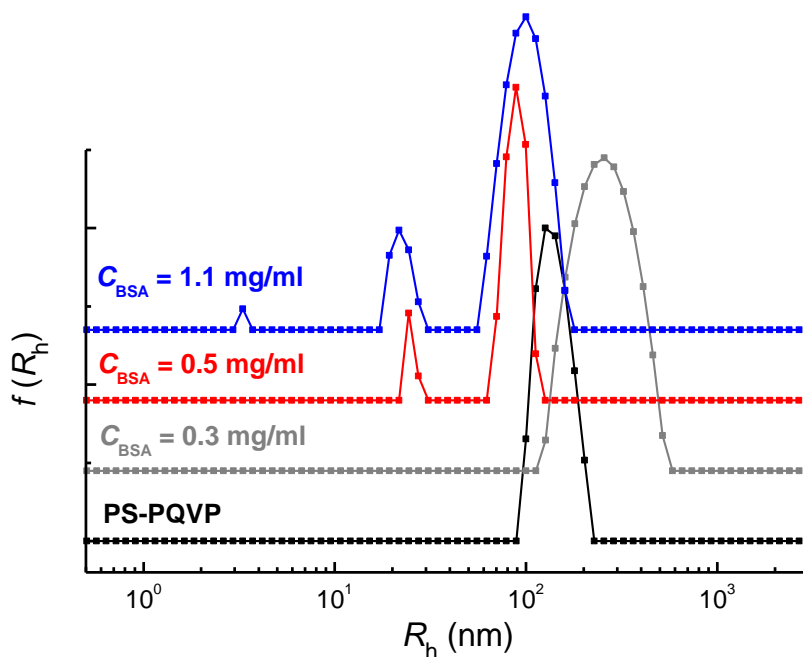
4. Σφαιρικές, υβριδικές νανοδομές οι οποίες σχηματίστηκαν μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των θετικά φορτισμένων πολυηλεκτρολυτικών αλυσίδων PQVP της κορώνας των μικκυλίων που σχηματίζει το συμπολυμερές PS-PQVP και των αρνητικά φορτισμένων επιφανειακών περιοχών του μορίου της πρωτεΐνης BSA. Η διαδικασία της σύμπλεξης μεταξύ των πολυηλεκτρολυτικών μικκυλίων και της πρωτεΐνης μελετήθηκε σε υδατικά διαλύματα με pH 7 και ιοντική ισχύ 0.01 M, συναρτήσεως της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης BSA στο διάλυμα, ή ισοδύναμα της αναλογίας φορτίων $[-]/[+]$. Μετρήσεις DLS κατέδειξαν ότι η διαλυτότητα, η μάζα και το μέγεθος των σχηματιζόμενων συμπλόκων εξαρτώνται από τη συγκέντρωση της BSA στο διάλυμα (ή ισοδύναμα από την αναλογία φορτίων $[-]/[+]$), όπως φαίνεται στο Σχήμα 16 όπου παρουσιάζονται οι μετρούμενες τιμές της έντασης σκέδασης στις 90° , I_{90} , και της υδροδυναμικής ακτίνας, R_h , (η οποία προκύπτει μέσω της ανάλυσης cumulant) συναρτήσεως της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης, C_{BSA} , για τα διαλύματα των συμπλόκων του συστήματος PS-PQVP/BSA σε pH 7 και ιοντική ισχύ 0.01 M. Συγκεκριμένα, για $C_{BSA} \leq 0.3$ mg/ml παρατηρείται καθίζηση στα διαλύματα των συμπλόκων, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα σχηματιζόμενα σύμπλοκα δεν είναι σταθερά, πιθανότατα λόγω της εξουδετέρωσης των φορτίων. Παρόλα αυτά, μεγάλα σε μέγεθος σύμπλοκα (ή συσσωματώματα) εξακολουθούν να βρίσκονται στο υπερκείμενο διάλυμα. Καθώς η

συγκέντρωση της πρωτεΐνης αυξάνεται τα σύμπλοκα διατηρούν τη διαλυτότητά τους, όμως τόσο η μάζα όσο και το μέγεθος τους μειώνονται συναρτήσει της C_{BSA} .



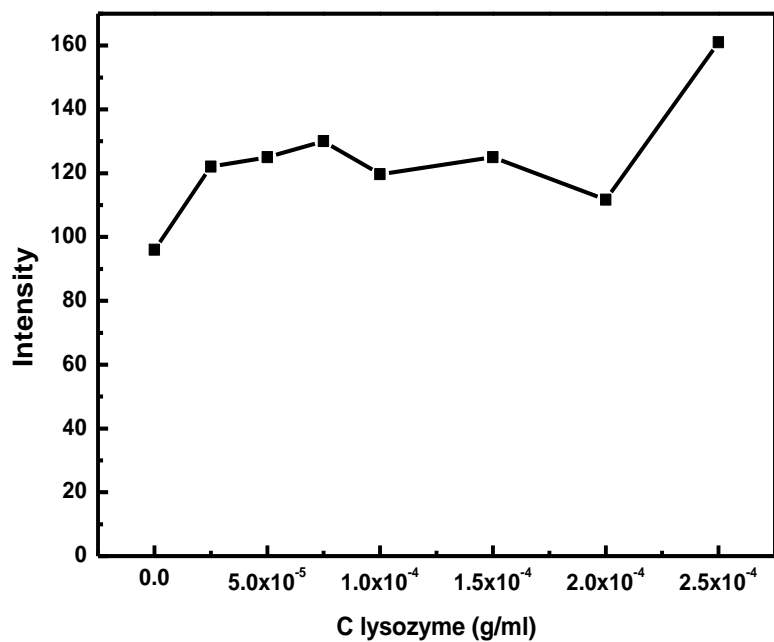
Σχήμα 16: Ένταση σκέδασης στις 90° , I_{90} , και υδροδυναμική ακτίνα, R_h , (η οποία προκύπτει μέσω της ανάλυσης cumulant) συναρτήσει της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης για τα διαλύματα των συμπλόκων του συστήματος PS-PQVP/BSA σε pH 7 και ιοντική ισχύ 0.01 M.

Συμπληρωματικές πληροφορίες σχετικά με τους διάφορους πληθυσμούς που συνυπάρχουν στα διαλύματα των συμπλόκων παρέχουν οι κατανομές των υδροδυναμικών ακτίνων που προκύπτουν μέσω της ανάλυσης CONTIN. Στο Σχήμα 17 παρουσιάζονται οι κατανομές των υδροδυναμικών ακτίνων, R_h , για αντιπροσωπευτικές τιμές της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης (η αντίστοιχη κατανομή του PS-PQVP παρατίθενται επίσης για λόγους σύγκρισης), για τα διαλύματα των συμπλόκων του συστήματος PS-PQVP/BSA σε pH 7 και ιοντική ισχύ 0.01 M. Η παρατηρούμενη εμφάνιση της κορυφής περί τα 20 nm σε συνδυασμό με την παρατηρούμενη μείωση της μάζας (ανάλογη της έντασης σκέδασης) για τα σταθερά διαλύματα των συμπλόκων, οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η σύμπλεξη των πολυηλεκτρολυτικών μικκυλίων του συμπολυμερούς PS-PQVP με τα πρωτεϊνικά μόρια της BSA επιφέρει τη διάσπασή τους. Η διάσπαση αυτή των αρχικών μικκυλίων του PS-PQVP έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό δύο διαφορετικών ειδών συμπλόκων, με τον μικρότερο σε μέγεθος πληθυσμό (περί τα 20 nm) να αποτελείται πιθανότατα από μικρό αριθμό μεμονωμένων δισυσταδικών αλυσίδων και πρωτεϊνικών μορίων, ενώ ο μεγαλύτερος σε μέγεθος πληθυσμός (περί τα 100 nm) ενδεχομένως προέρχεται από την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με τα διασπασμένα πολυηλεκτρολυτικά μικκύλια (τα οποία χαρακτηρίζονται από μικρότερη μάζα και μέγεθος σε σχέση με τα αρχικά).

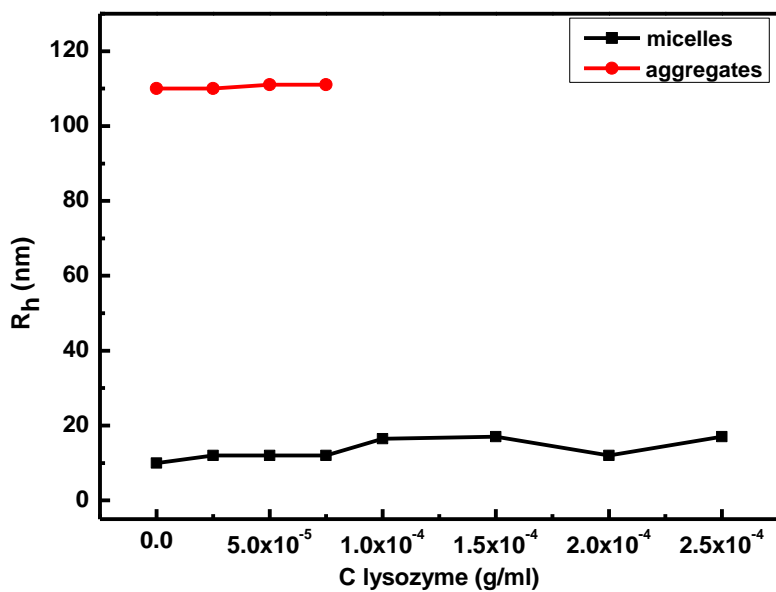


Σχήμα 17: Κατανομές υδροδυναμικών ακτίνων, R_h , για αντιπροσωπευτικές τιμές της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης (η αντίστοιχη κατανομή του PS-PQVP παρατίθενται επίσης για λόγους σύγκρισης), για τα διαλύματα των συμπλόκων του συστήματος PS-PQVP/BSA σε pH 7 και ιοντική ισχύ 0.01 M.

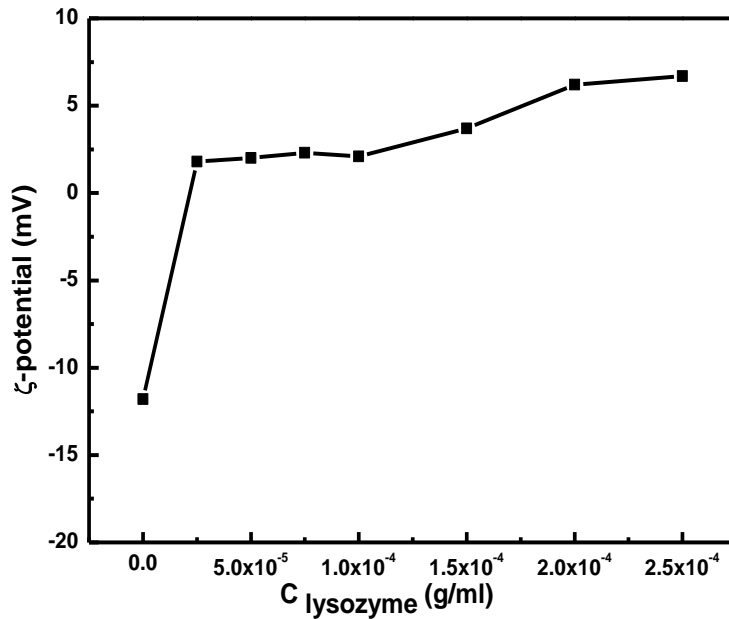
5. Συντέθηκαν 3D νανοδομές του συμπολυμερούς PnBA-PNIPAM-COOH με λυσοζύμη (HEWL). Οι νανοδομές αυτές ομοιάζουν με καψίδια ιών με πυρήνες από ακροδραστικά συμπολυμερή και πρωτεΐνες σαν εξωτερικό στρώμα. Η πρόσδεση της HEWL πραγματοποιείται λόγω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ιονισμένων καρβοξυλικών ομάδων που βρίσκονται στην περιφέρεια των μικκυλίων του συμπολυμερούς PnBA-PNIPAM-COOH και των κατιοντικών ομάδων της λυσοζύμης. Δυναμική, στατική και ηλεκτροφορητική σκέδαση φωτός (DLS, SLS και ELS αντίστοιχα) χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη των ιδιοτήτων των υβριδικών νανοδομών που συντέθηκαν και παρουσιάζονται στα Σχήματα 18, 19, και 20 αντίστοιχα. Καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο διάλυμα, παρατηρείται σταδιακή αύξηση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας λόγω της ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης μεταξύ της θετικά φορτισμένης λυσοζύμης και των ανιοντικών καρβοξυλομάδων του PnBA-PNIPAM-COOH. Όσον αφορά στο μέγεθος των συμπλόκων που σχηματίζονται, αρχικά παρατηρείται μικρή αύξηση στο μέγεθός τους η οποία οφείλεται στην σύμπλεξη με την πρωτεΐνη. Λόγω του μικρού μεγέθους της λυσοζύμης, μόλις 4 nm, η αύξηση του μεγέθους των συμπλόκων είναι μικρή. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα συσσωματώματα που παρατηρούνται αρχικά λόγω των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των καρβοξυλικών ομάδων του PnBA-PNIPAM-COOH σπάζουν καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο διάλυμα. Καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση της λυσοζύμης παρατηρείται ανακατανομή των αλυσίδων του συμπολυμερούς που αποτελούν την κορώνα του ώστε να καταστεί δυνατή η αλληλεπίδραση της θετικά φορτισμένης πρωτεΐνης με τα αρνητικά του φορτία.



Σχήμα 18: Αύξηση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας σε συνάρτηση με την αύξηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης στο διάλυμα.



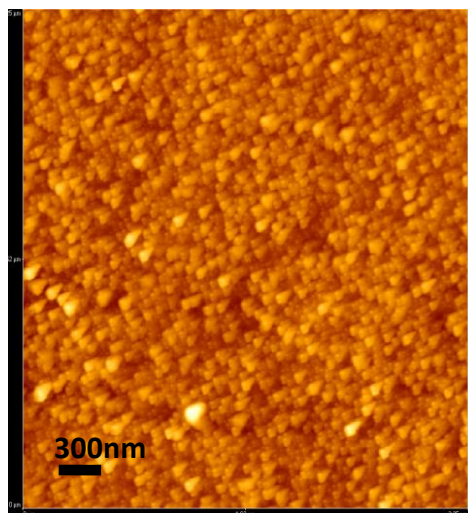
Σχήμα 19: Μέγεθος των μικυλίων και των συσσωματωμάτων των συμπλόκων PnBA-PNIPAM-COOH/HEWL σαν συνάρτηση της αύξησης της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης στο διάλυμα.



Σχήμα 20: Αύξηση του επιφανειακού φορτίου των συμπλόκων PnBA-PNIPAM-COOH/HEWL σαν συνάρτηση της αύξησης της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης στο διάλυμα.

Η σταδιακή αλλαγή του επιφανειακού φορτίου των συγκεκριμένων 3D νανοδομών στο διάλυμα με την αύξηση της συγκέντρωσης HEWL καταδεικνύει την πρόσδεση της πρωτεΐνης.

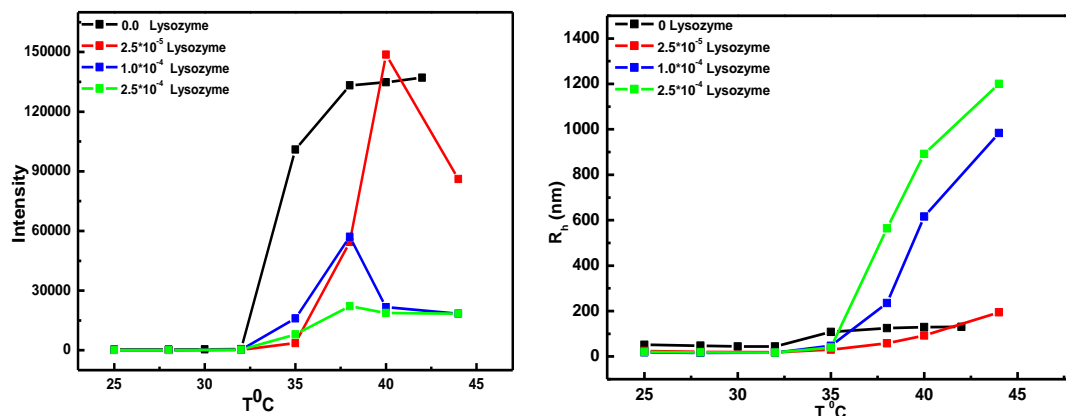
Περαιτέρω πληροφορίες για την δομή του υβριδικού PnBA-PNIPAM-COOH/HEWL συλλέχθηκαν μέσω τεχνικών φασματοσκοπίας. Η δομή της HEWL δεν αλλοιώνεται με την πρόσδεση στα μικκύλια του PnBA-PNIPAM-COOH. Χρησιμοποιώντας τεχνικές AFM μικροσκοπίας παρατηρήθηκε ο σχηματισμός σφαιρικών δομών στην επιφάνεια των οποίων είναι εμφανής η πρόσδεση λυσοζύμης (Σχήμα 21).



Σχήμα 21: Εικόνα AFM όπου παρατηρείται ο σχηματισμός σφαιρικών δομών PnBA-PNIPAM-COOH/HEWL. Λόγω του μικρού μεγέθους της λυσοζύμης και της χαμηλής διακριτικής ικανότητας του οργάνου δεν διακρίνονται τα μόρια της λυσοζύμης που περιβάλλουν το PnBA-PNIPAM-COOH.

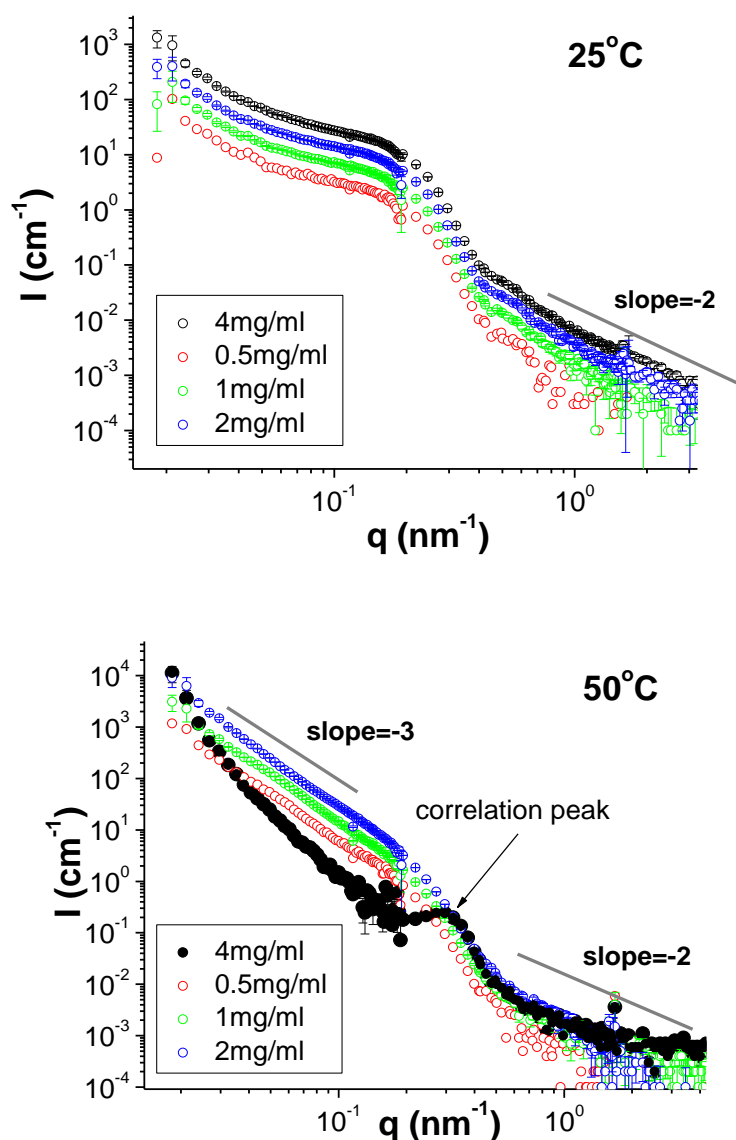
Οι νανοδομές PnBA-PNIPAM-COOH/HEWL είναι αποκρίσιμες στην θερμοκρασία. Η αποκρισιμότητά τους εξαρτάται από τη συγκέντρωση της HEWL στο διάλυμα. Καθώς

αυξάνεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο διάλυμα, παρατηρείται αύξηση του μεγέθους των συσσωματωμάτων με αύξηση της θερμοκρασίας.



Σχήμα 22: Αύξηση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας (αριστερά) και μέγεθος των μικκυλίων και των συσσωματωμάτων του PnBA-PNIPAM-COOH/ HEWL (δεξιά) σε συνάρτηση με την αύξηση της θερμοκρασίας.

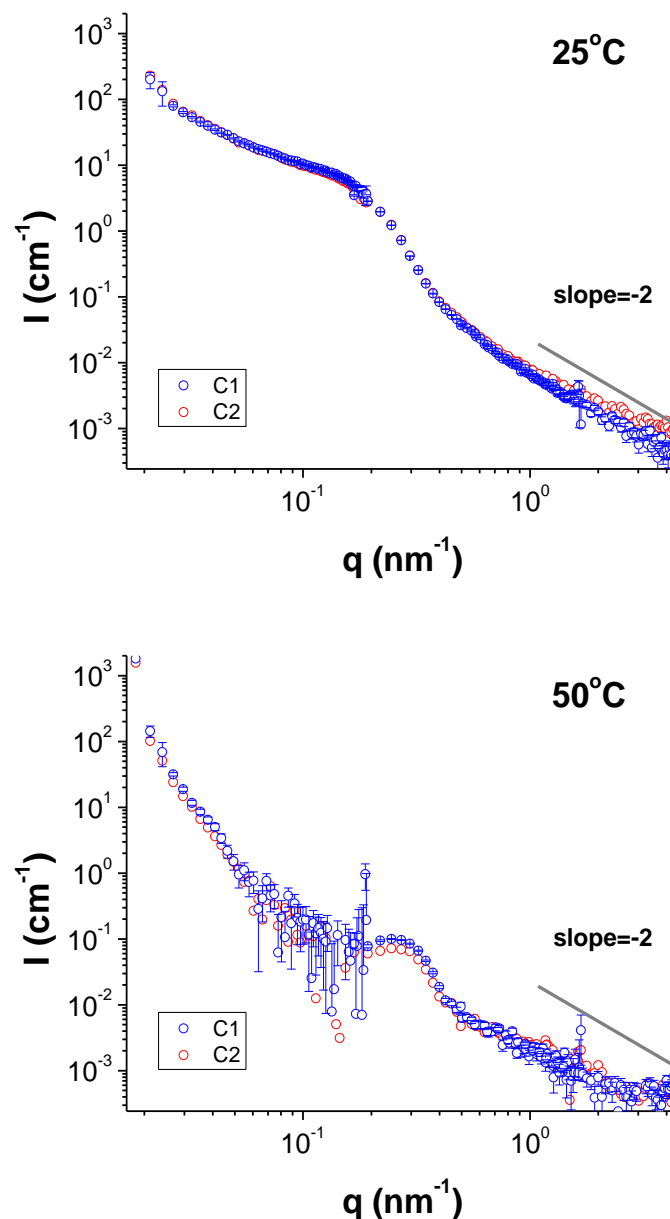
Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε σκέδαση νετρονίων σε μικρές γωνίες (SANS) για το σύστημα PnBA-b-PNIPAM-COOH. Στο σχήμα 23 φαίνονται τα αποτελέσματα για διάφορες θερμοκρασίες και συγκεντρώσεις.



Σχήμα 23: Αποτελέσματα SANS για θερμοκρασίες κάτω και πάνω από τη θερμοκρασία LCST (32°C) PNIPAM στο σύστημα PnBA-b-PNIPAM-COOH.

Σε θερμοκρασία 25°C το σχήμα των καμπυλών είναι ανεξάρτητο της συγκέντρωσης και η ένταση αυξάνεται αναλογικά με τη συγκέντρωση. Αυτό σημαίνει ότι η δομή των συσσωματωμάτων είναι σταθερή. Σε ενδιάμεσα q φαίνεται χαρακτηριστική σκέδαση από σφαιρικά μικκύλια με το PnBA στον υδρόφοβο πυρήνα. Σε μεγάλα q παρατηρείται σκέδαση από fractal διάστασης 2. Αυτή μπορεί να οφείλεται στη διαμόρφωση των αλυσίδων PAA και PNIPAM της κορώνας. Σε χαμηλά q η αύξηση της έντασης υποδηλώνει συσσωμάτωση των μικυλίων. Σε μεγάλες θερμοκρασίες (50°C) η συσσωμάτωση γίνεται εντονότερη λόγω της μετατροπής του PNIPAM σε υδρόφοβη ομάδα. Στη μεγαλύτερη συγκέντρωση το προφίλ σκέδασης είναι διαφορετικό. Η δομή fractal σε χαμηλά q έχει μεγάλο εκθέτη και σε ενδιάμεσα q εμφανίζεται καθαρή ένδειξη μεγίστου λόγω έντονης αλληλεπίδρασης μεταξύ των μικκυλίων.

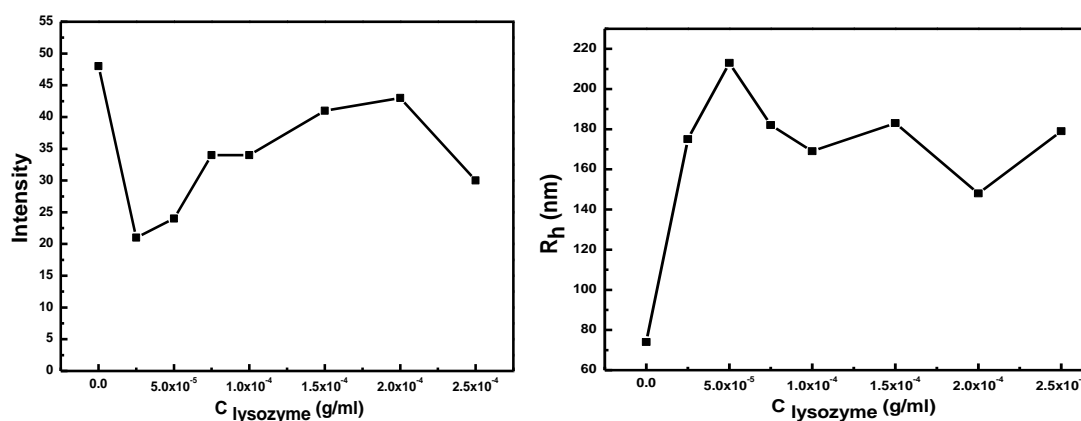
Επίσης μελετήθηκε τη σύμπλεξη του PnBA-b-PNIPAM-COOH με λυσοζύμη σε υδατικά διαλύματα χρησιμοποιώντας την τεχνική SANS. Στο σχήμα 24 φαίνονται τα αποτελέσματα για διάφορες θερμοκρασίες και συγκεντρώσεις.



Σχήμα 24: Αποτελέσματα SANS για θερμοκρασίες κάτω και πάνω από τη θερμοκρασία LCST (32°C) PNIPAM στο σύστημα PnBA-b-PNIPAM-COOH (2mg/ml) κατά τη σύμπλεξη του με λυσοζύμη σε συγκεντρώσεις C1=0.1 και C2=0.2mg/ml.

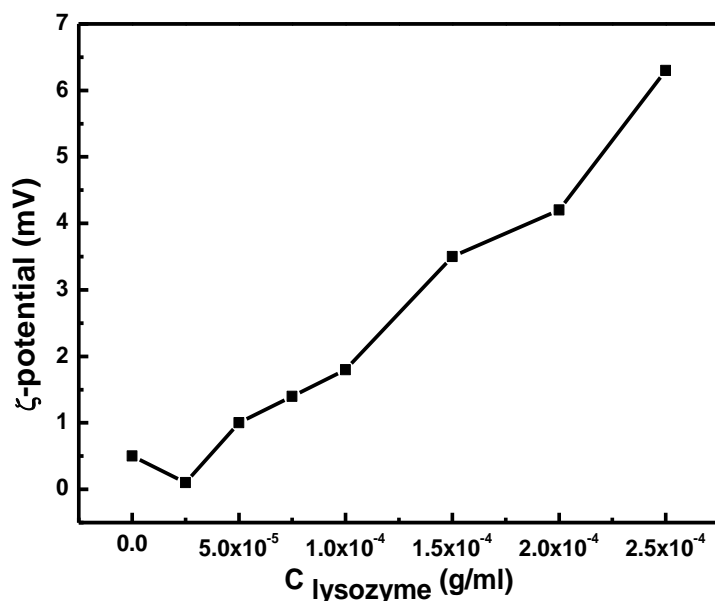
Σε θερμοκρασία 25°C το σχήμα των καμπυλών δείχνει μικρή επίδραση της λυσοζύμης στη συσσωμάτωση (μικρά q). Σε θερμοκρασία 50°C η δομή fractal σε χαμηλά q έχει μεγάλο εκθέτη και σε ενδιάμεσα q εμφανίζεται καθαρή ένδειξη μεγίστου λόγω έντονης αλληλεπίδρασης μεταξύ των μικκυλίων. Αυτή η συμπεριφορά οφείλεται στην παρουσία λυσοζύμης διότι σε ίδια συγκέντρωση καθαρού πολυμερούς δεν παρατηρήθηκε.

6. Σχηματίστηκαν 3D νανοδομές που αποτελούνται από το τρισυσταδικό τριπολυμερές PEO-PNIPAM-PAA και λυσοζύμη (HEWL). Η πρόσδεση της HEWL πραγματοποιείται λόγω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ιονισμένων καρβοξυλικών ομάδων που βρίσκονται στην συστάδα του PAA του συμπολυμερούς και των κατιοντικών ομάδων της λυσοζύμης. Η διαδικασία της σύμπλεξης μεταξύ των μακρομορίων μελετήθηκε σε pH 7 και ιοντική ισχύ 0.01 M, συναρτήσεως της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης HEWL στο διάλυμα. Δυναμική, στατική και ηλεκτροφορητική σκέδαση φωτός (DLS, SLS και ELS αντίστοιχα) χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη των ιδιοτήτων των υβριδικών νανοδομών που συντέθηκαν. Από τις μετρήσεις σκέδασης φωτός, παρατηρήθηκε αύξηση στο μέγεθος των συσσωματωμάτων PEO-PNIPAM-PAA/HEWL αυξάνοντας την συγκέντρωση της λυσοζύμης (Σχήμα 25). Αξίζει να σημειωθεί ότι η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας παραμένει σχεδόν σταθερή για όλες τις συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης. Αυτό σημαίνει ότι αν και σχηματίζονται συσσωματώματα PEO-PNIPAM-PAA/HEWL αυτά είναι χαλαρά συνδεδεμένα, με αποτέλεσμα να μην παρατηρείται αύξηση στη μάζα των συμπλόκων και κατ' επέκταση αξιοσημείωτη αύξηση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας.



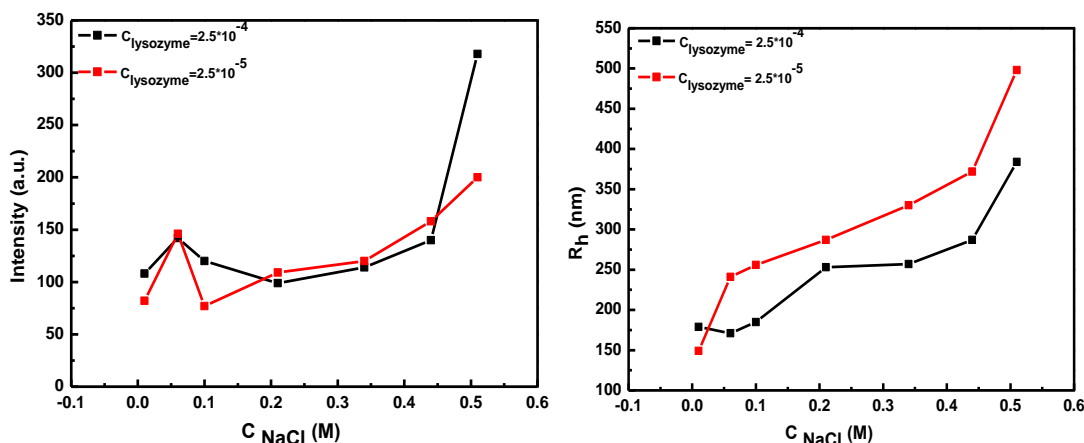
Σχήμα 25: Αύξηση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας (αριστερά) και μέγεθος των μικκυλίων και των συσσωματωμάτων του PEO-PNIPAM-PAA/HEWL (δεξιά) σε συνάρτηση με την αύξηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης.

Με μετρήσεις ηλεκτροφορητικής και δυναμικής σκέδασης φωτός, παρατηρήθηκε η σταδιακή αλλαγή του επιφανειακού φορτίου καθώς και της μάζας των συγκεκριμένων 3D νανοδομών στο διάλυμα με την αύξηση της συγκέντρωσης HEWL, γεγονός που καταδεικνύει την πρόσδεση της πρωτεΐνης (Σχήμα 26).



Σχήμα 26: Αύξηση του επιφανειακού φορτίου των συμπλόκων PEO-PNIPAM-PAA/HEWL σαν συνάρτηση της αύξησης της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης στο διάλυμα.

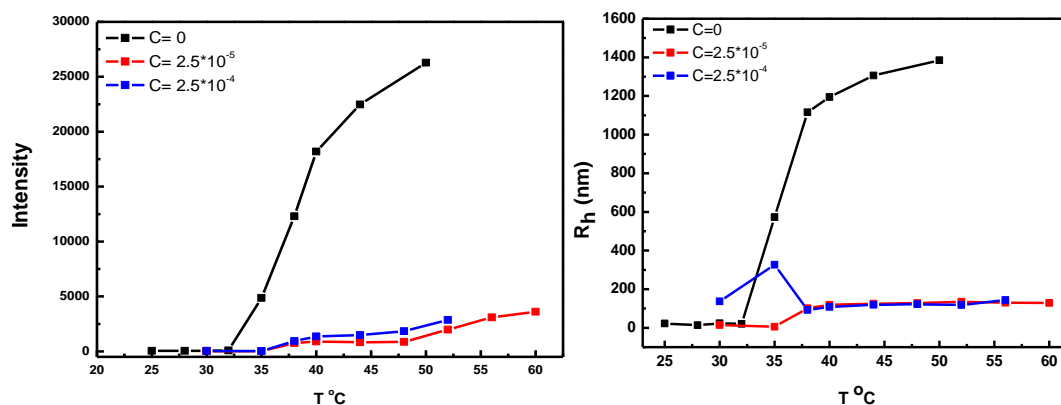
Επίσης, διερευνήθηκε η επίδραση της αύξησης της ιοντικής ισχύος του διαλύματος σε 0.5 N στη μάζα και το μέγεθος των ήδη σχηματισμένων συμπλόκων. Θα περίμενε κανείς την διάσπαση των συμπλόκων PEO-PNIPAM-PAA/HEWL αυξάνοντας την ιοντική ισχύ του διαλύματος. Εντούτοις, παρατηρήθηκε μια δευτερογενής συσσωμάτωση. Μέρος των δεσμών H^+ που σχηματίζονται αρχικά μεταξύ των συστάδων PEO και PAA, σπάζουν με αποτέλεσμα την δημιουργία συμπλόκων χαλαρά συνδεδεμένων, με τάση να δημιουργημένε σύμπλοκα μεγαλύτερου μεγέθους (Σχήμα 27).



Σχήμα 27: Αύξηση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας (αριστερά) και μέγεθος των μικκυλίων και των συσσωματωμάτων του PEO-PNIPAM-PAA/HEWL (δεξιά) σε συνάρτηση με την αύξηση της ιοντικής ισχύος στο διάλυμα για δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης.

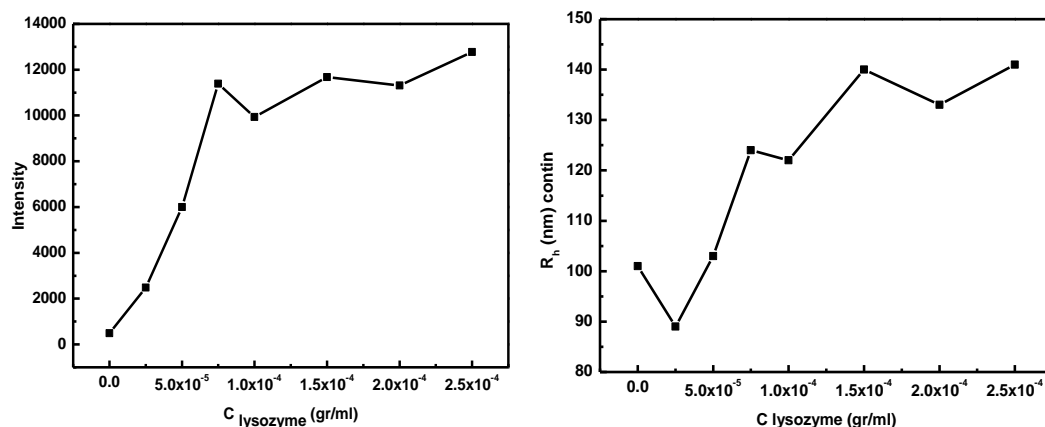
Στη συνέχεια διερευνήθηκε η θερμική απόκριση των νανοδομών που σχηματίστηκαν και παρατηρήθηκε ότι εξαρτάται από τη συγκέντρωση της HEWL στο διάλυμα (Σχήμα 28). Επιλέχθηκαν δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις λυσοζύμης, και παρατηρήθηκε ότι και στις δύο περιπτώσεις το σημείο μετάπτωσης μετατοπίστηκε κατά 4 °C σε σχέση με το καθαρό πολυμερές. Η παρουσία της λυσοζύμης αλλάζει την ικανότητα θερμοαπόκρισης της συστάδας του PNIPAM, με αποτέλεσμα να μετατοπίζεται η θερμοκρασία μετάπτωσης. Η παρουσία της λυσοζύμης αποτρέπει περαιτέρω συσσωμάτωση του συστήματος καθώς δεν

είναι δυνατές οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δομικών συστατικών του συμπολυμερούς PEO-PNIPAM-PAA.



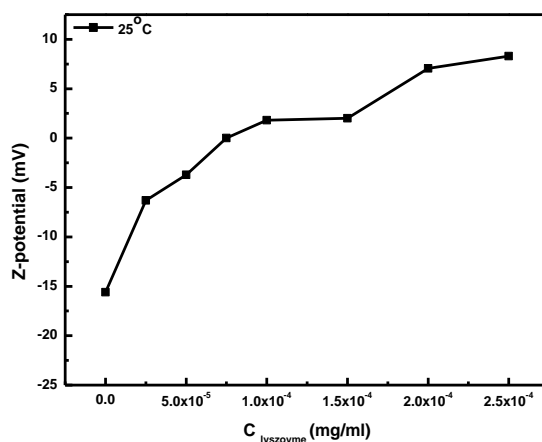
Σχήμα 28: Μεταβολή της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας (αριστερά) και του μεγέθους των συμπλόκων του PEO-PNIPAM-PAA/HEWL (δεξιά) σε συνάρτηση με την αύξηση της θερμοκρασίας για δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης.

7. Σχηματισμός 3D νανοδομών μεταξύ του τρισυσταδικού συμπολυμερούς PnBA-PNIPAM-PAA και της πρωτεΐνης λυσοζύμη (HEWL). Και σε αυτή την περίπτωση, η πρόσδεση της HEWL πραγματοποιείται λόγω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ιονισμένων καρβοξυλικών ομάδων που βρίσκονται στην συστάδα του PAA του συμπολυμερούς και των κατιοντικών ομάδων της λυσοζύμης. Η διαδικασία της σύμπλεξης μεταξύ των μακρομορίων μελετήθηκε σε pH 7 και ιοντική ισχύ 0.01 M, συναρτήσε της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης HEWL στο διάλυμα. Χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές δυναμικής, στατικής και ηλεκτροφορητικής σκέδασης φωτός (DLS, SLS και ELS αντίστοιχα) για την μελέτη των ιδιοτήτων των υβριδικών νανοδομών που συντέθηκαν και παρουσιάζονται στα Σχήματα 29 και 30. Από τις μετρήσεις σκέδασης φωτός, παρατηρήθηκε τόσο αύξηση στο μέγεθος των συσσωματωμάτων PnBA-PNIPAM-PAA/HEWL αυξάνοντας την συγκέντρωση της λυσοζύμης όσο και αύξηση στην ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας, λόγω της δημιουργίας συμπλόκων μεταξύ του συμπολυμερούς PnBA-PNIPAM-PAA και της λυσοζύμης.



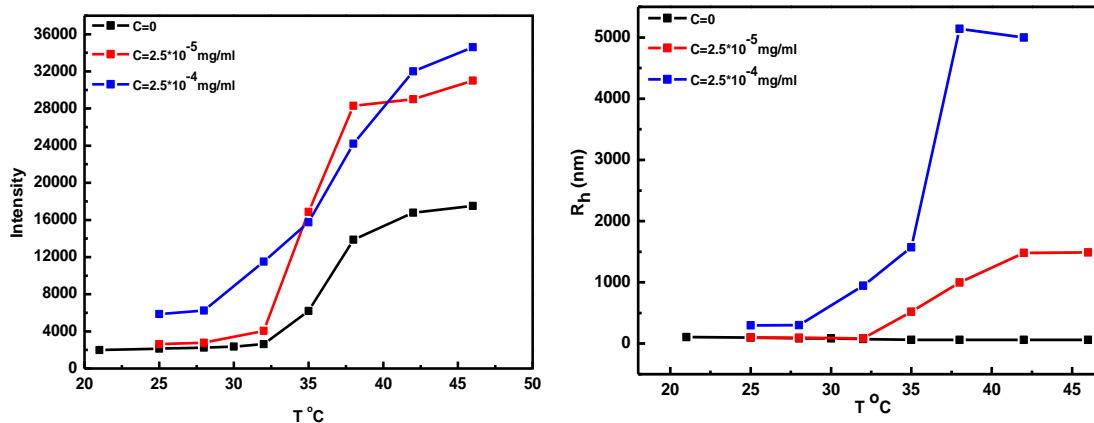
Σχήμα 29: Αύξηση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας (αριστερά) και μέγεθος των μικκυλίων και των συσσωματωμάτων του PnBA-PNIPAM-PAA/HEWL (δεξιά) σε συνάρτηση με την αύξηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης.

Από τις μετρήσεις ηλεκτροφορητικής σκέδασης φωτός, παρατηρήθηκε η σταδιακή αλλαγή του επιφανειακού φορτίου με την αύξηση της συγκέντρωσης HEWL, γεγονός που καταδεικνύει την πρόσδεση της πρωτεΐνης (Σχήμα 30).

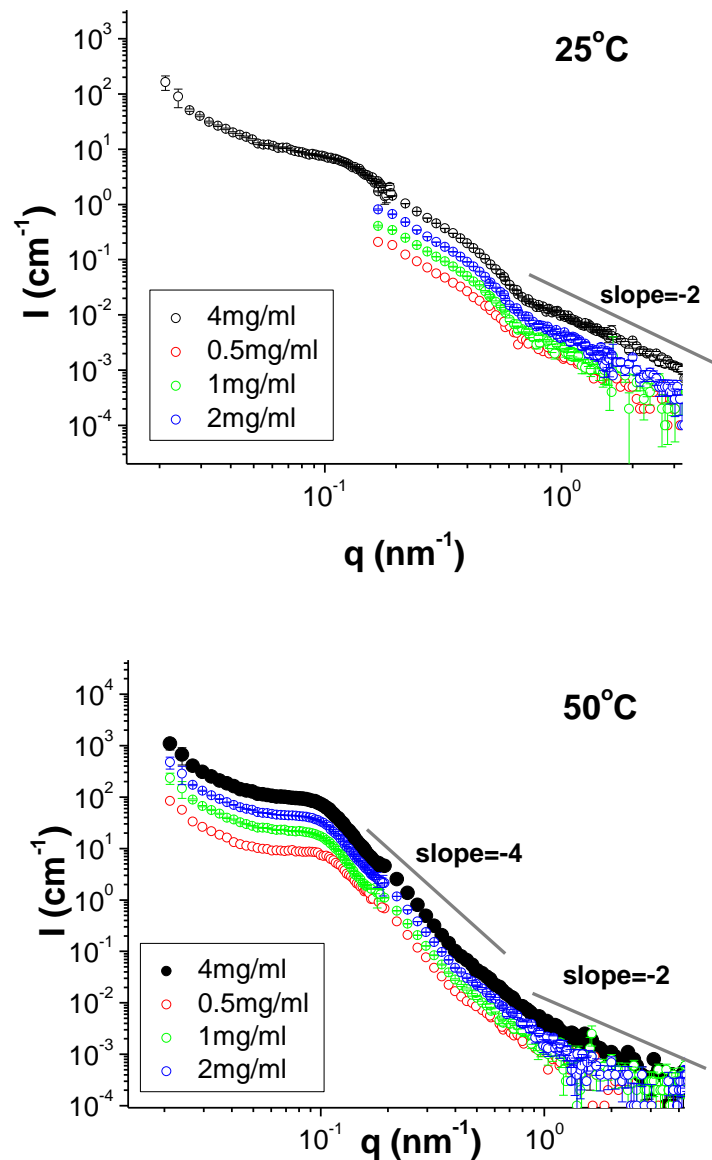


Σχήμα 30: Αύξηση του επιφανειακού φορτίου των συμπλόκων PnBA-PNIPAM-PAA/HEWL σαν συνάρτηση της αύξησης της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης στο διάλυμα.

Στη συνέχεια διερευνήθηκε η θερμική απόκριση των νανοδομών που σχηματίστηκαν και παρατηρήθηκε ότι εξαρτάται από τη συγκέντρωση της HEWL στο διάλυμα (Σχήμα 31). Επιλέχθηκαν δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις λυσοζύμης, και παρατηρήθηκε ότι και στις δύο περιπτώσεις το σημείο μετάπτωσης παρέμεινε το ίδιο σε σχέση με το καθαρό πολυμερές. Σε αυτή την περίπτωση παρατηρείται έντονη συσσωμάτωση του συστήματος με αύξηση της θερμοκρασίας καθώς αλλάζει η υδροφοβοβικότητα της συστάδας του PNIPAM.

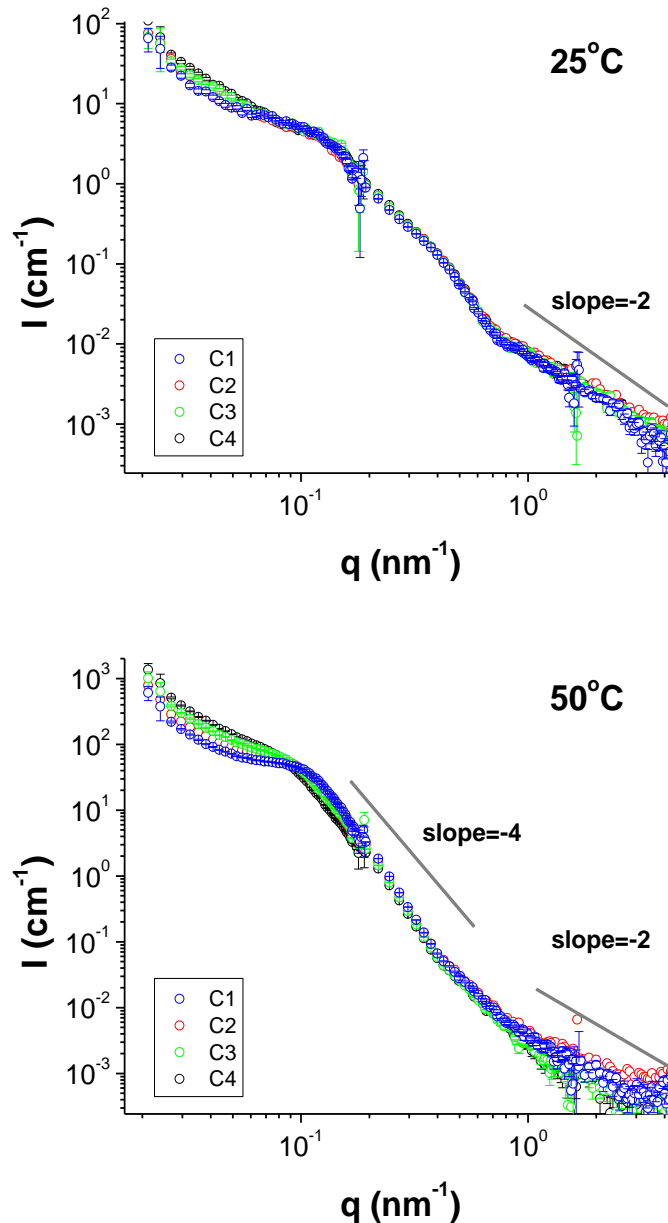


Σχήμα 31: Μεταβολή της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας (αριστερά) και του μεγέθους των συμπλόκων του PnBA-PNIPAM-PAA/HEWL (δεξιά) σε συνάρτηση με την αύξηση της θερμοκρασίας για δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης.



Σχήμα 32: Αποτελέσματα SANS για θερμοκρασίες κάτω από τη θερμοκρασία LCST (32°C) PNIPAM στο σύστημα PnBA-b-PNIPAM-b-PAA (οι μετρήσεις σε χαμηλά q για χαμηλές συγκεντρώσεις για 25°C ήταν δύσκολο να πραγματοποιηθούν λόγω χαμηλής έντασης στη σκέδαση).

Στο σχήμα 32 φαίνονται τα αποτελέσματα για διάφορες θερμοκρασίες και συγκεντρώσεις για το τριπολυμερές PnBA-b-PNIPAM-b-PAA σε υδατικά διαλύματα. Φαίνεται ότι η επίδραση της θερμοκρασίας είναι πιο έντονη σε αυτό το σύστημα σε σύγκριση με το PnBA-b-PNIPAM-COOH. Το προφίλ της σκέδασης μετατρέπεται από αυτό των συσσωματωμένων μικυλλίων σε σκέδαση από συσσωματώματα με καλά καθορισμένη διεπιφάνεια (κλίση -4 σε ενδιάμεσα q). Τα δύο συστήματα δείχνουν ότι η παρουσία πολυηλεκτρολύτικης ομάδας σε αντιδιαστολή με την τελική καρβοξυλική ομάδα μεταβάλλει δραματικά την απόκριση του συστήματος στην άνοδο της θερμοκρασίας.

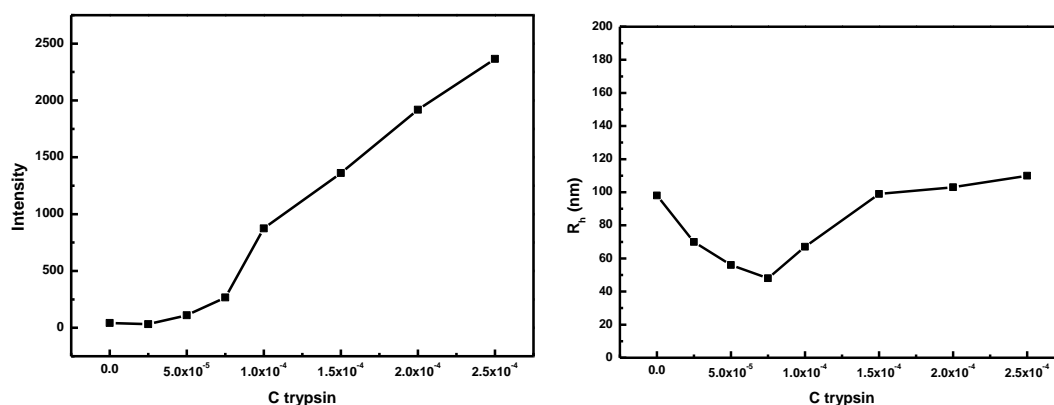


Σχήμα 33: Αποτελέσματα SANS για θερμοκρασίες κάτω και πάνω από τη θερμοκρασία LCST (32°C) PNIPAM στο σύστημα PnBA-b-PNIPAM-PAA (2.4 mg/ml) κατά τη σύμπλεξή του με λυσοζύμη σε συγκεντρώσεις C1=0.1, C2=0.2, C3=0.3 και C4=0.4mg/ml.

Στο σχήμα 33 φαίνονται τα αποτελέσματα για διάφορες θερμοκρασίες και συγκεντρώσεις για το PnBA-b-PNIPAM-b-PAA κατά τη σύμπλεξή του με λυσοζύμη. Η αύξηση της συγκέντρωσης της λυσοζύμης προκαλεί συστηματική αύξηση στη συσσώματωση των μικυλίων. Με αύξηση της θερμοκρασίας δημιουργούνται καλά καθορισμένες δομές, με παρόμοιες διαφοροποιήσεις σε χαμηλά q , όπως και στη χαμηλή θερμοκρασία. Στους 50°C η δομή ακολουθεί αυτή του καθαρού συστήματος (χωρίς λυσοζύμη) με σκέδαση από καλά καθορισμένες διεπιφάνειες στα ενδιάμεσα q .

8. Σχηματίστηκαν επίσης 3D νανοδομές που αποτελούνται από το δυσσταδικό συμπολυμερές PNIPAM-PAA ($M_w = 40000$ και σύσταση 50% PAA και 50% PNIPAM), και θρυψίνη (Tryp). Και σε αυτή την περίπτωση, η πρόσδεση της θρυψίνης γίνεται μέσω ηλεκτρικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ιοντισμένων ομάδων της καρβοξυλομάδας της συστάδας του PAA και κατιοντικών ομάδων της Tryp. Η διαδικασία της σύμπλεξης μεταξύ των μακρομορίων μελετήθηκε σε pH 7 και ιοντική ισχύ 0.01 M, συναρτήσει της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης Tryp στο διάλυμα. Δυναμική και στατική σκέδαση φωτός (DLS και SLS) χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη των ιδιοτήτων των υβριδικών νανοδομών που συντέθηκαν. Σε διάστημα λίγων λεπτών από την ανάμειξη του συμπολυμερούς PNIPAM-b-PAA με την Tryp παρατηρήθηκε καταβύθιση του συστήματος με αποτέλεσμα να μην καταστεί δυνατή η μελέτη τους και η εξαγωγή συμπερασμάτων.

Εναλλακτικά, σχηματίστηκαν και μελετήθηκαν 3D νανοδομές που αποτελούνται από το δυσσταδικό συμπολυμερές PNIPAM6K-b-PAA ($M_w = 8600$ και σύσταση 30% PAA και 70% PNIPAM), και θρυψίνη (Tryp). Και σε αυτή την περίπτωση, η πρόσδεση της θρυψίνης γίνεται μέσω ηλεκτρικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ιοντισμένων ομάδων της καρβοξυλομάδας της συστάδας του PAA και κατιοντικών ομάδων της Tryp. Η διαδικασία της σύμπλεξης μεταξύ των μακρομορίων μελετήθηκε σε pH 7 και ιοντική ισχύ 0.01 M, συναρτήσει της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης Tryp στο διάλυμα. Δυναμική και στατική σκέδαση φωτός (DLS και SLS αντίστοιχα) χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη των ιδιοτήτων των υβριδικών νανοδομών που συντέθηκαν (Σχήμα 34).

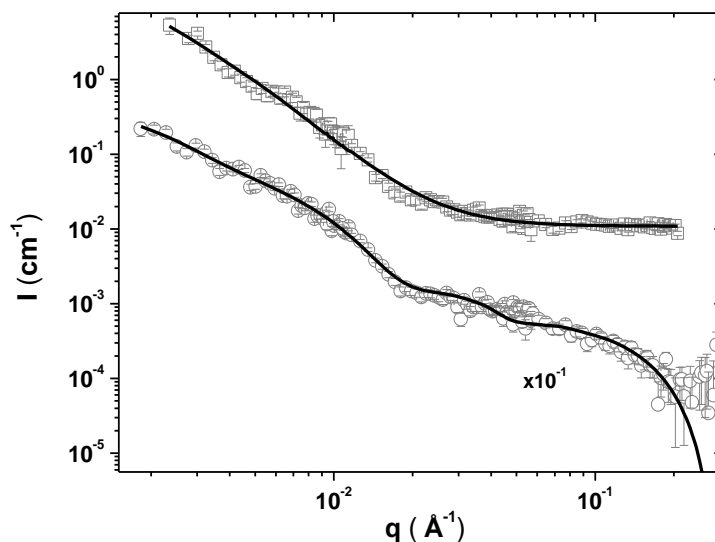


Σχήμα 34: Μεταβολή της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας (αριστερά) και του μεγέθους των μικκυλίων και των συσσωματωμάτων του PNIPAM6K-b-PAA/ PNIPAM6K-b-PAA (δεξιά) σε συνάρτηση με την αύξηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης.

Επίσης, έγινε λεπτομερής μελέτη των μεταβολών που παρατηρούνται στην αυτοοργάνωση και την σταθερότητα των συμπλόκων PNIPAM-b-PAA/Tryp με αλλαγές στη θερμοκρασία. Δυστυχώς, παρατηρήθηκε ότι τα σύμπλοκα PNIPAM-b-PAA/Tryp δεν ήταν σταθερά με την πάροδο του χρόνου, λόγω της ιδιότητας της θρυψίνης να σπάει τους αμιδικούς δεσμούς, με αποτέλεσμα να μην μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα σε σχέση με την σταθερότητα και την αυτοοργάνωση τους με αλλαγές στη θερμοκρασία.

9. Η αλληλεπίδραση των μικκυλίων PS-SCPI-PEO με τη θετικά φορτισμένη σφαιρική πρωτεΐνη λυσοζύμη μελετήθηκε με τη μέθοδο SANS (FRMII - όργανο KWS1), η οποία έδειξε ότι 92 μόρια λυσοζύμης προσκολλώνται ανά μικκύλιο για το PS-SCPI-PEO. Τα μόρια αυτά προσκολλώνται κατά προτίμηση στο εσωτερικό τμήμα της κορόνας όπου βρίσκονται τα φορτισμένα τμήματα SCPI. Πρόκειται δηλαδή για αλληλεπίδραση κατεξοχήν ηλεκτροστατικής φύσεως. Η λυσοζύμη στην περίπτωση του SCPI-PS-PEO προσκολλάται στο εσωτερικό αλλά και στο εξωτερικό κομμάτι λόγω ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης με

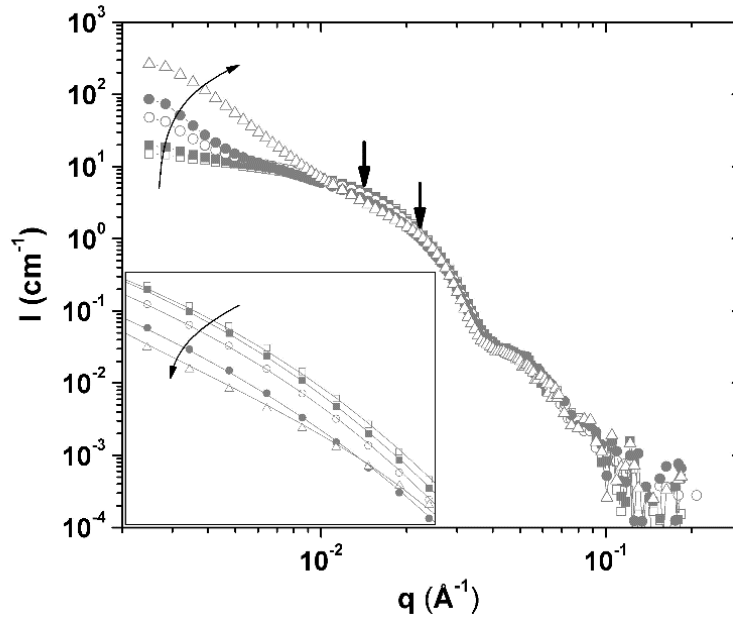
τα τμήματα SCPI. Όμως ο αριθμός των μορίων λυσοζύμης είναι πολύ μικρότερος στο εσωτερικό (265) από ότι στο εξωτερικό (770) και αυτό οφείλεται στην πολύ πιο αυξημένη συγκέντρωση πολυμερικών αλυσίδων στο εσωτερικό (στερικές απώσεις). Στο Σχήμα 31 φαίνονται τα πειραματικά αποτελέσματα SANS όπου είναι προφανείς οι διαφορές στις καμπύλες πριν και μετά την προσθήκη λυσοζύμης στο διάλυμα SCPI-PS-PEO.



Σχήμα 35: Πειραματικά αποτελέσματα από SANS σε διάλυμα PSCI-PS-PEO (τετράγωνα) και PSCI-PS-PEO με προσθήκη λυσοζύμης. Οι συνεχείς γραμμές είναι προσαρμογή με αριθμητικά μοντέλα.

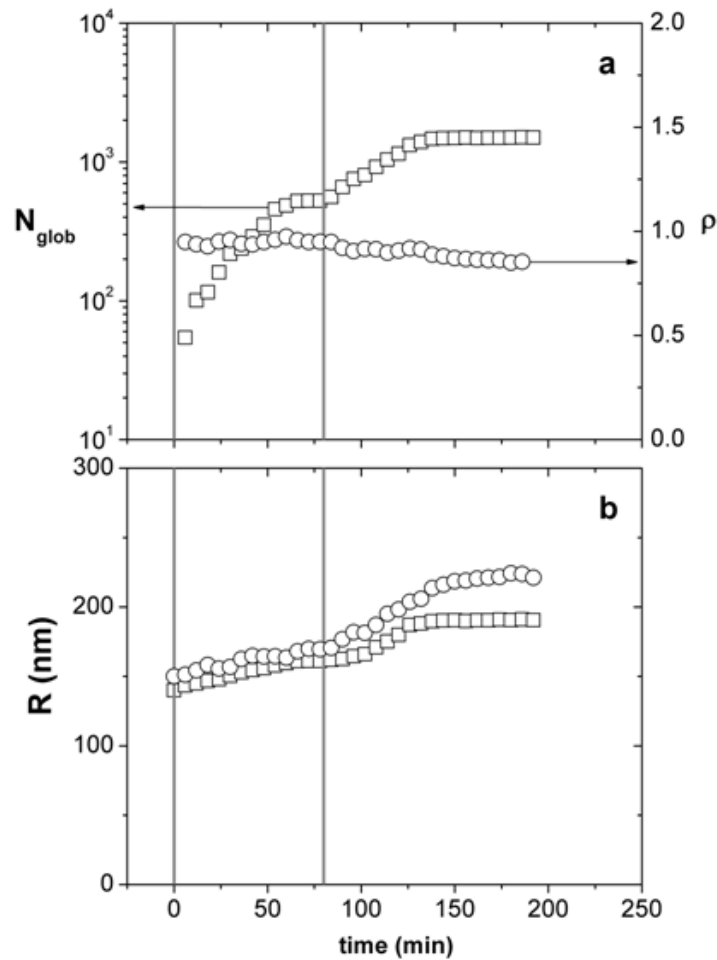
10. Στην επίσκεψη στο τμήμα Φυσικής στο Πανεπιστήμιο του Μονάχου έγιναν αρχικές δοκιμές (FCS) με συμπλοκοποίηση των μικκυλίων PnBA-PAA με λυσοζύμη που έδειξαν ότι η ροδαμίνη συμπλέκεται με τα μικκύλια και όχι με τη λυσοζύμη. Η μελέτη με σκέδαση φωτός έδειξε έντονη προσκόλληση της λυσοζύμης στα μικκύλια.

Η συμπλοκοποίηση των μικκυλίων PnBA-PAA με λυσοζύμη μελετήθηκε διεξοδικά με LS, ELS και SANS (KWS1-FRMI). Στο Σχήμα 32 φαίνεται η μεταβολή των καμπυλών SANS με την αύξηση της συγκέντρωσης της λυσοζύμης στο διάλυμα. Σε μεγάλες κλίμακες μήκους (μικρά q) φαίνονται έντονες μεταβολές λόγω της ενίσχυσης της συσσωμάτωσης των μικκυλίων λόγω παρουσίας της λυσοζύμης. Σε ενδιάμεσα q , μικρές αλλά συστηματικές μεταβολές (που ακολουθούνται από το αριθμητικό μοντέλο όπως φαίνεται στο ένθετο του Σχήματος 36) φανερώνουν το φόρτωμα των μικκυλίων με λυσοζύμη. Σε μεγάλα q η μη-μεταβολή των καμπυλών δείχνει ότι ο πυρήνας των μικκυλίων είναι άθικτος από τη σύμπλεξη με λυσοζύμη.



Σχήμα 36: Αποτελέσματα SANS από αλληλεπίδραση της λυσοζύμης και των μικκυλίων PnBA-b-PAA. Η συγκέντρωση των μικκυλίων είναι 0.6 mg/ml και η αναλογία της λυσοζύμης αυξάνεται κατά την πορεία του βέλους.

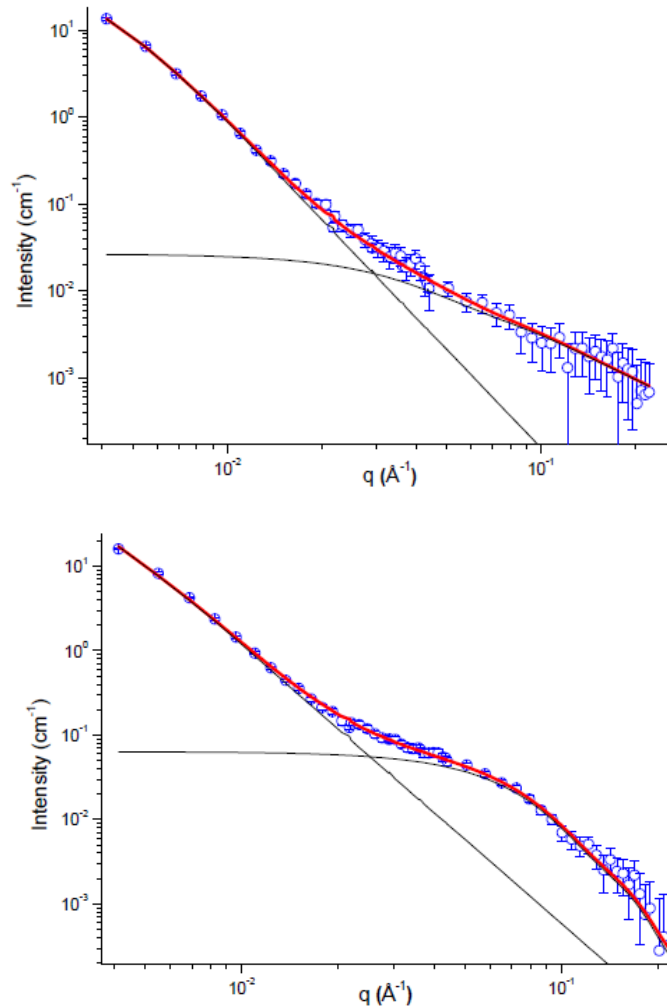
11. Κατά την επίσκεψη στο εθνικό εργαστήριο CNMS (Oakridge, USA) μελετήθηκε ο τρισυσταδικός (PEO-PNIPAM-PAA) και ο δισυσταδικός (PNIPAM-PAA) πολυηλεκτρολύτης κατά τη συμπλοκοποίησή του με λυσοζύμη καθώς και η κινητική της αλλαγής της διαμόρφωσης των συμπλόκων κατά την θερμοαποκρινόμενη μετάβαση του PNIPAM. Χρησιμοποιήθηκε σκέδαση φωτός σε όργανο πολλαπλών ανιχνευτών ώστε να είναι δυνατή η παρακολούθηση της κινητικής καθώς και TEM για την απεικόνιση της μορφολογίας τους σε χαμηλές και υψηλές θερμοκρασίες. Στο Σχήμα 33 παρουσιάζεται η κινητική της συμπλοκοποίησης της λυσοζύμης με συσσωματώματα PEO-b-PNIPAM-b-PAA. Αρχικά το μέγεθος των συσσωματωμάτων αυξάνεται ασθενώς ενώ ο αριθμός των συμπλεγμένων πρωτεϊνών έντονα. Λίγο μετά τα 75 min (δεξιά κάθετος στο σχήμα 37) ο φαινομενικός αριθμός συμπλεγμένων πρωτεϊνών είναι μεγαλύτερος από το συνολικό αριθμό τους στο διάλυμα άρα η φαινόμενη αυτή αύξηση οφείλεται σε περαιτέρω συσσωμάτωση των υπαρχόντων συσσωματωμάτων που συνοδεύεται με εντονότερη αύξηση των ακτινών.



Σχήμα 37: (a) Αριθμός σφαιριδίων λυσοζύμης ανά συσσωμάτωμα (τετράγωνα) και χαρακτηριστικός λόγος R_g/R_h και (b) γυροσκοπική (τετράγωνα) και υδροδυναμική ακτίνα (κύκλοι) για PEO-b-PNIPAM-b-PAA (0.1 mg/ml, pH 7 και 0.01M NaCl) σε σύμπλεξη με λυσοζύμη (0.025 mg/ml, pH 7 και 0.01M NaCl) στους 25 °C.

12. Πραγματοποιήθηκαν αρχικές μετρήσεις σκέδασης φωτός και φασματοσκοπίας φθορισμού για την ανίχνευση σύμπλεξης/αλληλεπίδρασης μικκυλίων PS-QP2VP με BSA με χρήση ενσωματωμένων νανοσωματιδίων χρυσού στα μικκύλια. Επιπλέον έγιναν αρχικές μετρήσεις SANS για τη συσσωμάτωση των μικκυλίων PS-QP2VP με BSA (σταθμός LLB Saclay France).

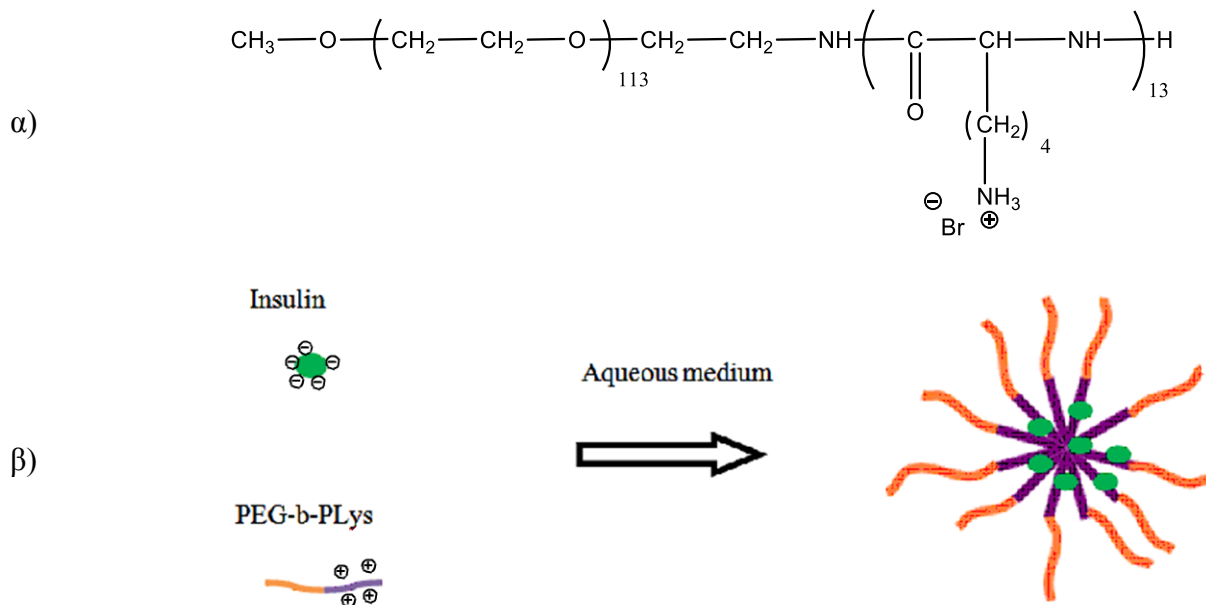
13. Στο Σχήμα 38 παρουσιάζονται αποτελέσματα SANS με και χωρίς προσθήκη BSA σε διάλυμα συσσωματωμάτων QNPHOS. Η παρουσία BSA εμφανίζει έντονη αλλαγή στην καμπύλη σε ενδιάμεσα και μεγάλα q . Τα θεωρητικά μοντέλα αποτελούνται από συνεισφορές δύο κυριάρχων κλιμάκων μήκους για τα αντικείμενα στο διάλυμα.



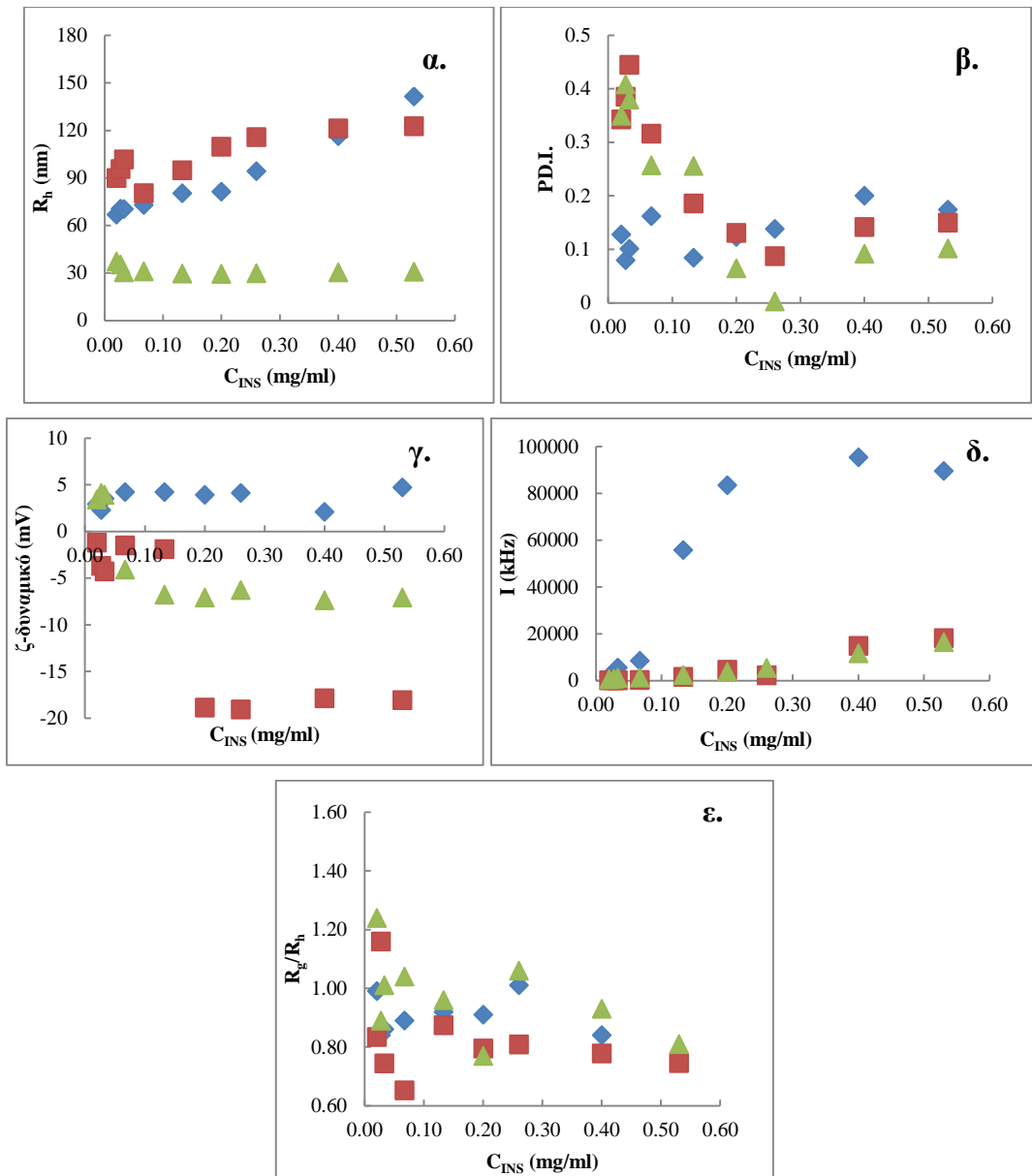
Σχήμα 38: SANS από QNPHOS (0.5mg/ml) (επάνω) και από μίγμα QNPHOS (0.033mg/ml) σε νερό και BSA (1.33 mg/ml). Οι συνεχείς καμπύλες (κόκκινες) είναι προσαρμογή με θεωρητικά μοντέλα και προέρχονται από άθροιση των λεπτότερων (μαύρων).

14. Αναπτύχθηκαν σφαιρικές 3D νανοδομές βασισμένες στο συμπολυμερές PEG-b-PLys (Σχήμα 39α) και την INS. Αρχικά, το συμπολυμερές PEG-b-PLys χαρακτηρίστηκε φυσικοχημικά με Δυναμική Σκέδαση Φωτός και η υδροδυναμική της ακτίνα βρέθηκε ίση με 67 nm. Με την προσθήκη άλατος παρατηρήθηκε αύξηση της υδροδυναμικής ακτίνας του πολυηλεκτρολύτη. Οι σφαιρικές 3D νανοδομές σχηματίστηκαν λόγω των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ της θετικά φορτισμένης πολυηλεκτρολυτικής συστάδας του συμπολυμερούς PLYs και των αρνητικά φορτισμένων της INS (διαθέτει βασικά αμινοξέα) (Σχήμα 39β). Η συγκέντρωση του συμπολυμερούς PEG-b-PLys διατηρήθηκε σταθερή σε δύο σειρές υδατικών διαλυμάτων (χαμηλής ιοντικής ισχύος και pH=7.00 και σε ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο προσομοιάζει τις συνθήκες του αίματος, απόντων των κυττάρων του, αντίστοιχα), ενώ η συγκέντρωση της ινσουλίνης κυμαινόταν από 0.020 (η ελάχιστη) σε 0.530 (η μέγιστη) mg/ml. Χρησιμοποιήθηκαν εννέα διαφορετικές συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης, για το σχηματισμό των συμπλόκων. Οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν για το φυσικοχημικό χαρακτηρισμό των σχηματιζόμενων νανοδομών ήταν η Δυναμική, η Στατική και η Ηλεκτροφορητική Σκέδαση του Φωτός. Οι νανοδομές που σχηματίστηκαν μέσα το διάλυμα χαμηλής ιοντικής ισχύος ήταν της τάξεων των 65-140 nm σε χαμηλές-υψηλές συγκεντρώσεις INS αντίστοιχα (Σχήματα 40, 41 και 42). Τα σχηματιζόμενα σύμπλοκα μέσα στο ρυθμιστικό

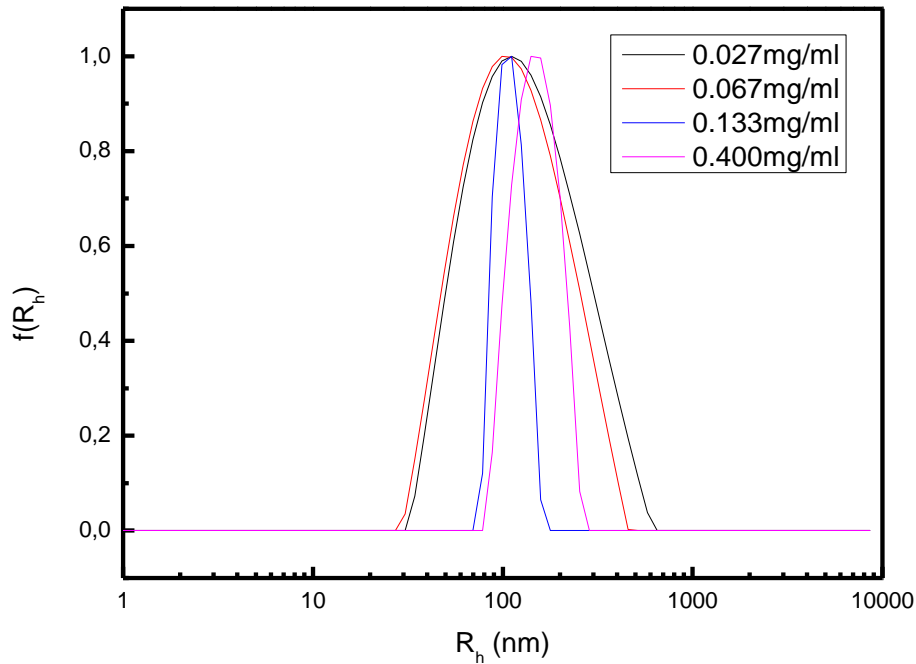
διάλυμα που προσομοιάζει τις φυσιολογικές συνθήκες του ανθρωπίνου οργανισμού ήταν της τάξεως των 100 nm, και αυξανόμενη της συγκέντρωσης της ινσουλίνης παρατηρήθηκε αύξηση της μάζας των συμπλόκων, ενώ σχηματίστηκαν συσσωματώματα σε υψηλές συγκεντρώσεις ινσουλίνης, η καθίζηση των οποίων κατέστη ορατή με γυμνό μάτι. Επίσης, διαπιστώθηκε πως η αύξηση της ιοντικής ισχύος του διαλύματος σε 0.5 N επηρέασε σημαντικά τη μάζα και τη μορφολογία των συμπλόκων, και η υδροδυναμική τους ακτίνα αυξήθηκε σημαντικά, ιδιαίτερα για τις νανοδομές, η σύμπλεξη των οποίων πραγματοποιήθηκε σε χαμηλή ιοντική ισχύ και σε pH=7.00.



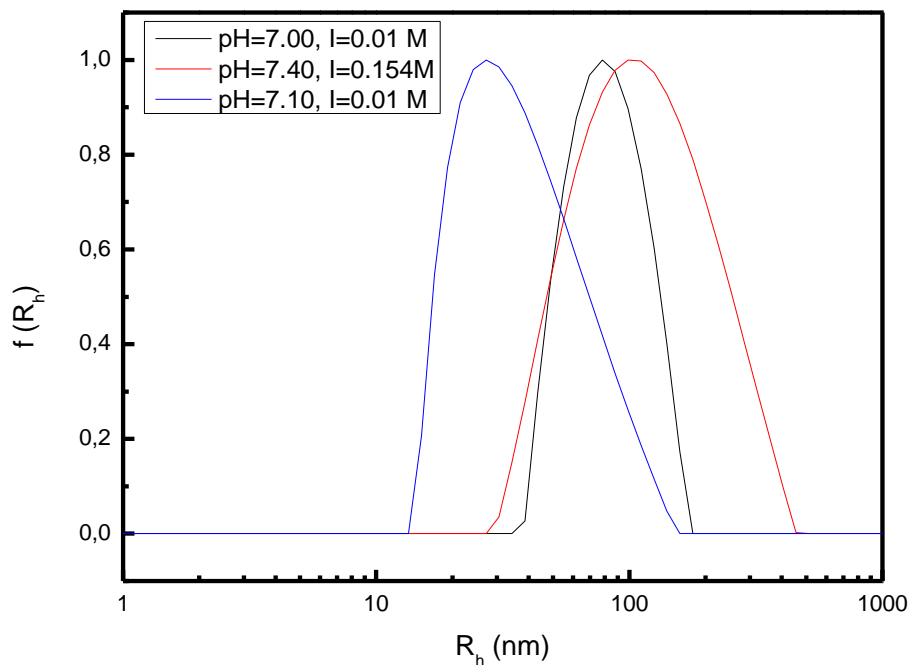
Σχήμα 39: α) Η χημική δομή του πολυηλεκτρολυτικού συμπολυμερούς κατά συστάδες PEG-b-PLys και β) η σχηματική αναπαράσταση του σχηματισμού των συμπλεγμάτων σύστασης PEG-b-PLys:INS.



Σχήμα 40: α) Υδροδυναμική ακτίνα, R_h , β) Δείκτης πολυδιασποράς, (PDI), γ) ζ-δυναμικό, δ) ένταση σκεδαζόμενης ακτινοβολίας 90° , I , και ε) R_g/R_h ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της ινσουλίνης C_{INS} , για τα διαλύματα των συμπλεγμάτων σύστασης PEG-b-PLys:INS που σχηματίστηκαν σε pH=7 και ιονική ισχύ 0.01M NaCl (διαμάντια), pH=7.1 και 0.01M (ρυθμιστικό διάλυμα Tris) (τρίγωνα) και pH=7.4 και 0.154M NaCl (τετράγωνα).

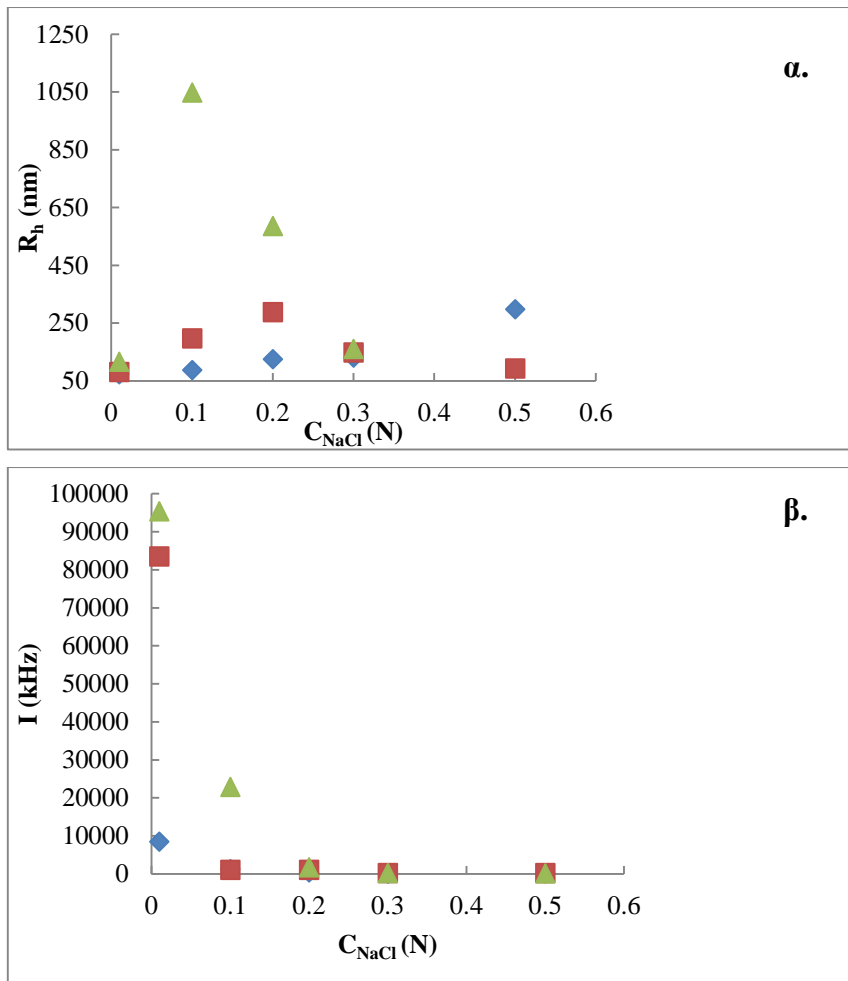


Σχήμα 41: Τα διαγράμματα κατανομής μεγέθους των συμπλεγμάτων PEG-b-PLys:INS που σχηματίστηκαν σε $\text{pH}=7.4$ και $I=0.154\text{M}$, σε γωνία σκέδασης $\theta=90^\circ$, ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της ινσουλίνης C_{INS} (η λεζάντα της εικόνας δείχνει διάφορες συγκεντρώσεις INS που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των συμπλεγμάτων). Οι κατανομές της υδροδυναμικής ακτίνας R_h αναλύθηκαν με το λογισμικό CONTIN.

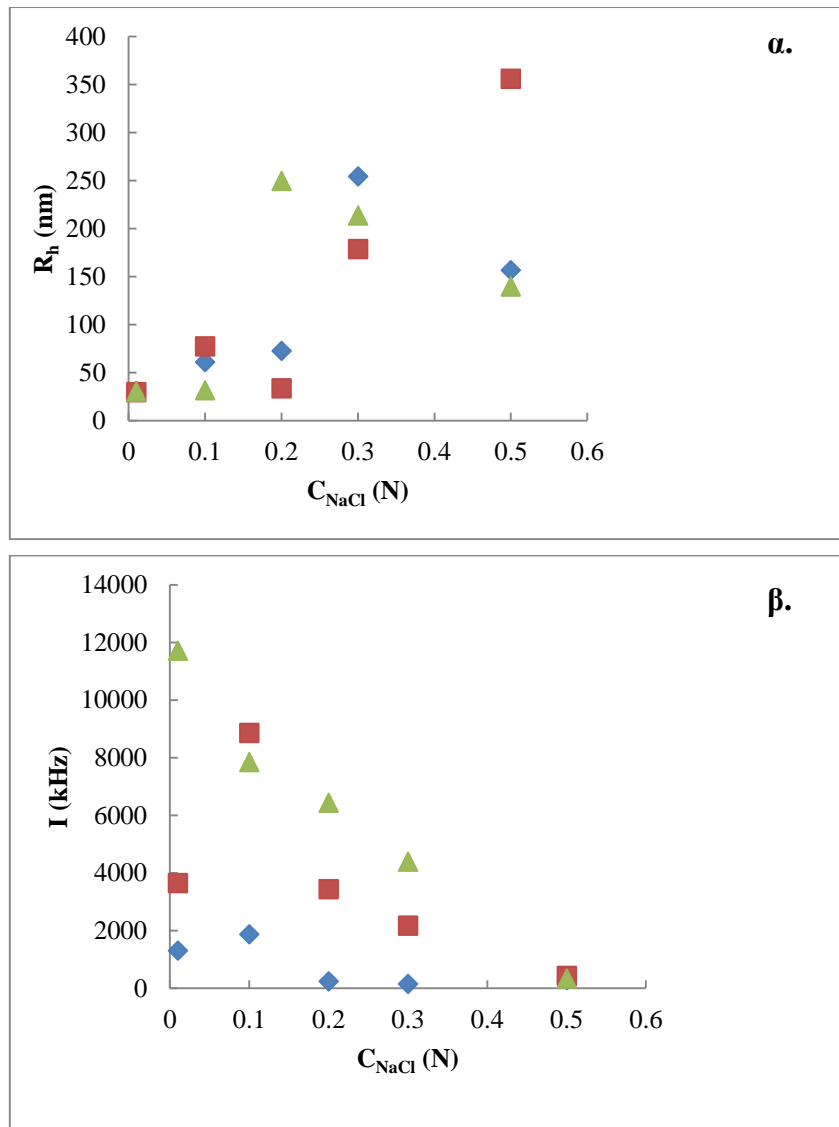


Σχήμα 42: Οι κατανομές της υδροδυναμικής ακτίνας των συμπλεγμάτων PEG-b-PLys:INS σε διαφορετικά υδατικά μέσα ($C_{\text{INS}}=0.067\text{mg/ml}$) στους 25°C , σε γωνία σκέδασης $\theta=90^\circ$. Οι κατανομές της R_h αναλύθηκαν με το λογισμικό CONTIN.

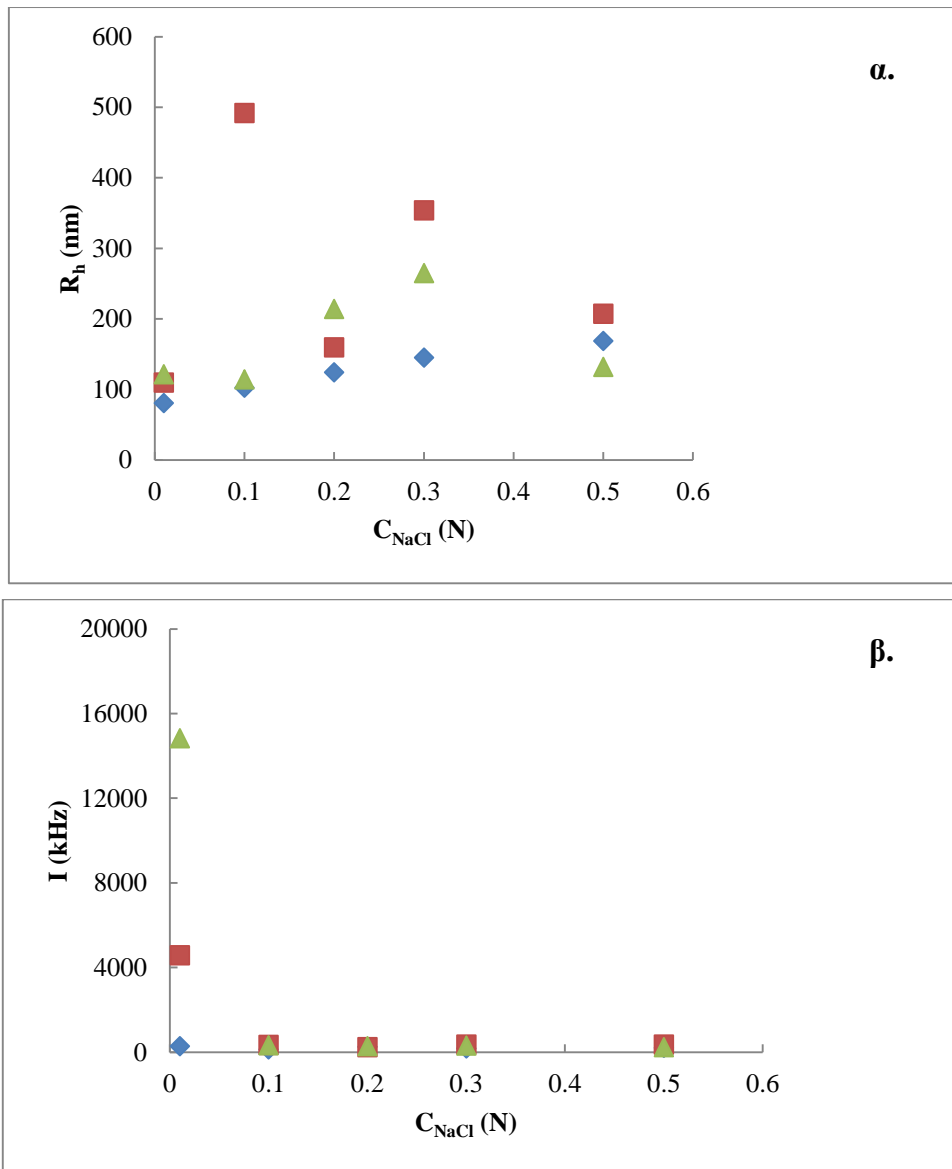
Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, έχει γενικά καθοριστεί πως η αύξηση της ιονικής ισχύος διαλυμάτων πολυηλεκτρολυτικών συμπλόκων με πεπτίδια/πρωτεΐνες βαθμιαία προκαλεί συσσωμάτωση των σχηματισθέντων συμπλόκων. Αυτό το αποτέλεσμα προκύπτει από τη «κάλυψη» των φορτίων, από την οποία εξασθενούν οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις των συστημάτων. Η αύξηση της ιονικής ισχύος των διαλυμάτων των συμπλεγμάτων οδηγεί στη μείωση του αποτελεσματικού φορτίου και στην συνεπακόλουθη εξασθένιση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, και αναμένεται ισχυρή επίδραση στη συνολική συμπεριφορά του διαλύματος αλλά και στη δομή/μορφολογία των σχηματισθέντων συμπλεγμάτων. Για να μελετηθεί αυτή η αλληλεπίδραση, οι μετρήσεις Δυναμικής Σκέδασης Φωτός ως συνάρτηση της προστιθέμενης συγκέντρωσης NaCl, και οι λαμβανόμενες τιμές I_{90} («διορθωμένες»/υπολογισμένες με βάση τη συγκέντρωση) και οι τιμές R_h για αντιπροσωπευτικά διαλύματα σε χαμηλές και υψηλές συγκεντρώσεις ινσουλίνης των PEG-b-PLys:INS συστημάτων σε pH 7.00, pH=7.10 και 7.40 παρουσιάζονται στα Σχήματα 43, 44 και 45. Σε pH=7.00 και pH=7.10, οι διασπορές των συμπλόκων παρουσιάζουν λίγο πολύ την ίδια ανταπόκριση στην αύξηση της ιονικής ισχύος εξαιτίας της παρόμοιας δομής των σχηματισμένων συμπλόκων σε κάθε διάλυμα (Σχήματα 43 και 44). Η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας μειώθηκε σημαντικά και αυτή η τάση είναι ανεξάρτητη από την αρχική συγκέντρωση της ινσουλίνης. Όπως αναφέρθηκε προηγούμενα, σε χαμηλές συγκεντρώσεις ινσουλίνης C_{INS} ο αριθμός των αλληλεπιδρώντων μορίων ινσουλίνης με κάθε αλυσίδα πολυηλεκτρολύτη είναι σχετικά μικρός, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις ινσουλίνης τα σχηματισθέντα σύμπλοκα χαρακτηρίζονται από μεγάλο αριθμό αλληλεπιδρώντων μορίων ινσουλίνης ανά αλυσίδα πολυηλεκτρολύτη. Επιπρόσθετα, μία σημαντική αύξηση της μάζας των συμπλεγμάτων παρατηρείται σε υψηλές συγκεντρώσεις ινσουλίνης κατά την προσθήκη του άλατος και στα δύο υδατικά μέσα. Η υδροδυναμική ακτίνα των συμπλόκων της ινσουλίνης ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του άλατος αυξήθηκε στην περίπτωση όπου τα σύμπλοκα σχηματίσθηκαν στο PBS (Σχήμα 45), ενώ η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας μειώθηκε σημαντικά.



Σχήμα 43: α) Υδροδυναμική ακτίνα, R_h , και β) ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας 90° , I , ως συνάρτηση της προστεθειμένης συγκέντρωσης $NaCl$ σε αντιπροσωπευτικά διαλύματα (0.067 mg/ml – διαμάντια, 0.200 mg/ml – τετράγωνα και 0.400 mg/ml – τρίγωνα), που αντιστοιχούν σε χαμηλή και υψηλή συγκέντρωση C_{INS} , για τα συμπλέγματα PEG-b-PLys:INS που παρασκευάστηκαν σε $pH=7$ και $I=0.01M$.



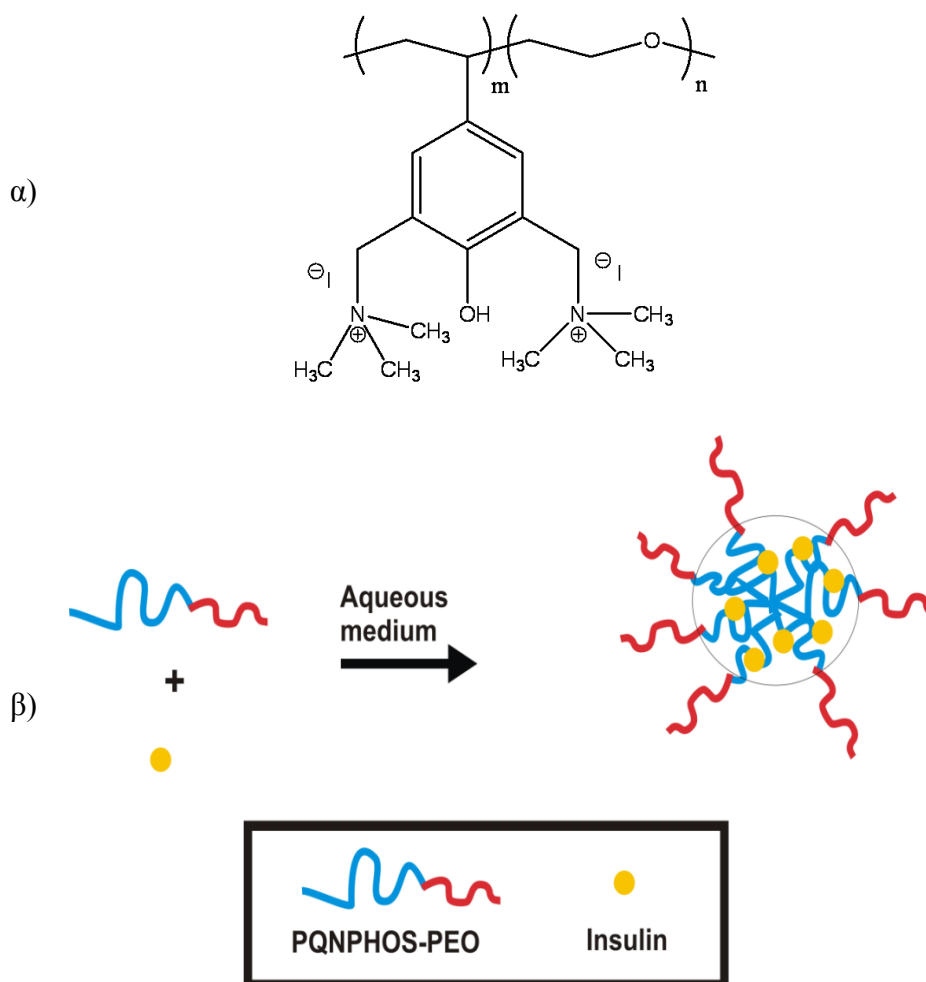
Σχήμα 44: α) Υδροδυναμική ακτίνα, R_h , και β) ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας 90° , I , ως συνάρτηση της προστεθειμένης συγκέντρωσης $NaCl$ σε αντιπροσωπευτικά διαλύματα (0.067 mg/ml – διαμάντια, 0.200 mg/ml – τετράγωνα και 0.400 mg/ml – τρίγωνα), που αντιστοιχούν σε χαμηλή και υψηλή συγκέντρωση C_{INS} , για τα συμπλέγματα PEG-b-PLys:INS που παρασκευάστηκαν σε pH=7.1 (ρυθμιστικό διάλυμα Tris).



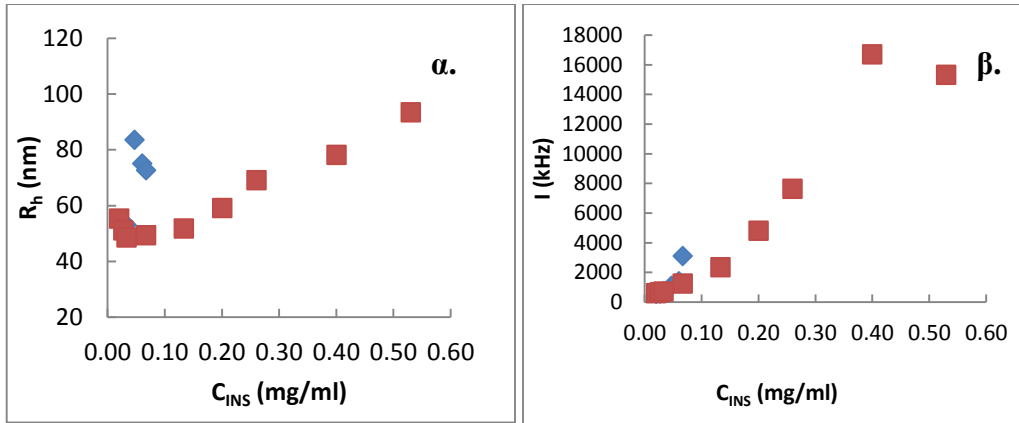
Σχήμα 45: α) Υδροδυναμική ακτίνα, R_h , και β) ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας 90° , I , ως συνάρτηση της προστεθειμένης συγκέντρωσης $NaCl$ σε αντιπροσωπευτικά διαλύματα (0.067 mg/ml – διαμάντια, 0.200 mg/ml – τετράγωνα και 0.400 mg/ml – τρίγωνα), που αντιστοιχούν σε χαμηλή και υψηλή συγκέντρωση C_{INS} , για τα συμπλέγματα PEG-b-PLys:INS που παρασκευάστηκαν σε pH=7.4 and $I=0.154M$ (PBS).

15. Η διαδικασία σύμπλεξης μεταξύ του πολυηλεκτρολύτη QNPHOS-PEO (η χημική δομή παρουσιάζεται στο Σχήμα 46α και της ινσουλίνης σε pH=7 και $I=0.01$ M και σε PBS (pH=7.40 και $I=0.154$ M) αρχικά μελετήθηκε με δυναμική σκέδαση φωτός. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι το PBS (pH=7.40) επιλέχθηκε καθώς προσομοιάζει το pH και την ιονική ισχύ του ανθρώπινου οργανισμού. Σε pH=7 οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις του συστήματος αναμένεται να είναι ισχυρότερες, καθώς ο πολυηλεκτρολύτης QNPHOS-PEO φέρει 2 θετικά φορτία ανά λειτουργική μονομερική μονάδα και η ινσουλίνη έχει -4 αρνητικά φορτία. Τα ληφθέντα αποτελέσματα από τις μετρήσεις δυναμικής σκέδασης φωτός σχετικά με τις τιμές της υδροδυναμικής ακτίνας, R_h , και της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας, I_{90} , («διορθώθηκε»/ υπολογίστηκε για την αύξηση της συγκέντρωσης) παρουσιάζονται στα Σχήματα 47, 48 και 49, ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης, C_{INS} , στα

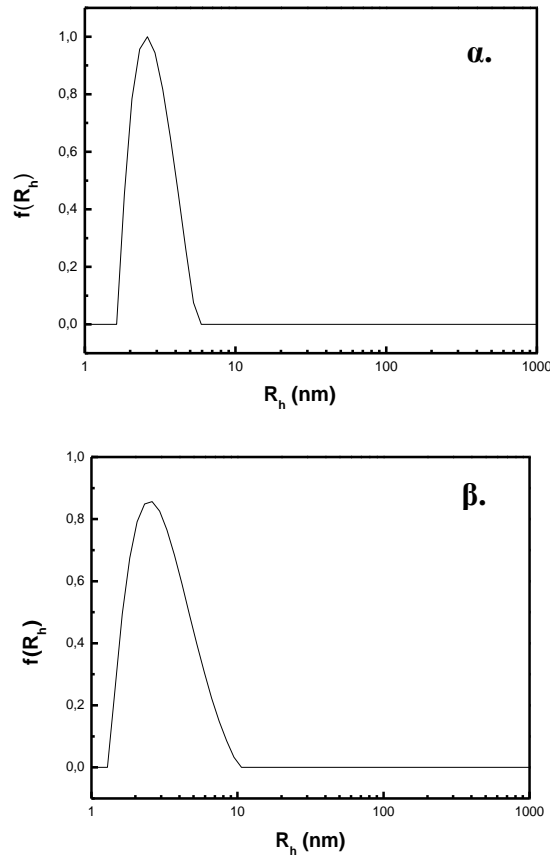
διαλύματα των συμπλεγμάτων. Η δομή και η διαδικασία σχηματισμού των συμπλόκων QNPHOS-PEO:INS παρουσιάζεται στο Σχήμα 46β. Η συγκέντρωση του συμπολυμερούς QNPHOS-PEO διατηρήθηκε σταθερή, ενώ η συγκέντρωση της ινσουλίνης κυμαινόταν από 0.020 (η ελάχιστη) σε 0.530 (η μέγιστη) mg/ml. Οι νανοδομές που σχηματίστηκαν μέσα το διάλυμα χαμηλής ιοντικής ισχύος ήταν της τάξεων των 50-70 nm σε χαμηλές συγκεντρώσεις ινσουλίνης, ενώ σχηματίστηκαν συσσωματώματα σε υψηλές συγκεντρώσεις ινσουλίνης, η καθίζηση των οποίων κατέστη ορατή με γυμνό μάτι (Σχήματα 47, 48 και 49). Τα σχηματιζόμενα σύμπλοκα μέσα στο ρυθμιστικό διάλυμα που προσομοιάζει τις φυσιολογικές συνθήκες του ανθρώπινου οργανισμού ήταν της τάξεως των 50-90 nm, και αυξανόμενης της συγκέντρωσης της ινσουλίνης παρατηρήθηκε αύξηση της μάζας των συμπλόκων, μείωση του ζ-δυναμικού και αλλαγή των μορφολογικών χαρακτηριστικών των νανοδομών (Σχήματα 47 και 51).



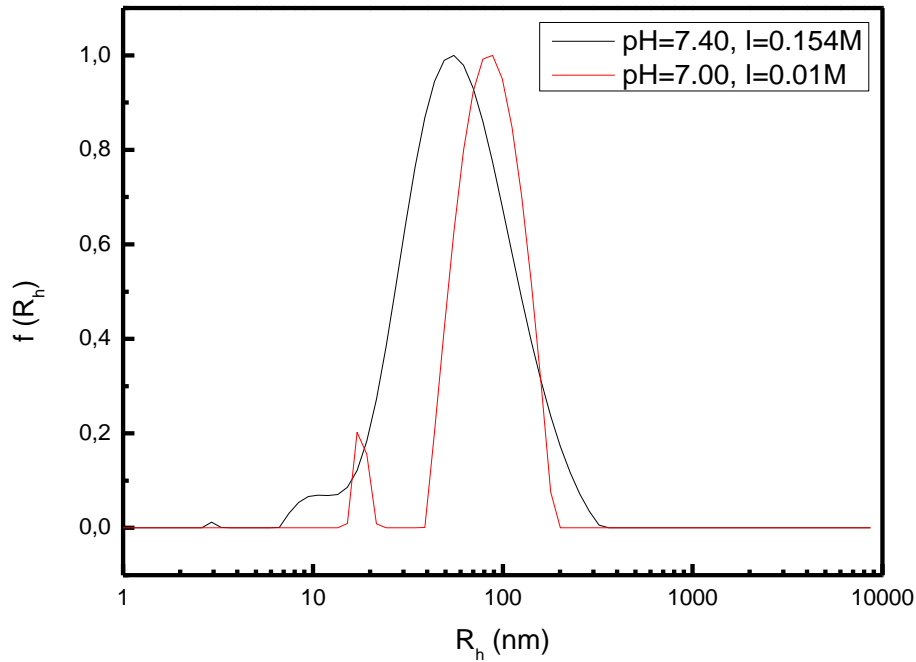
Σχήμα 46: α) Η χημική δομή του πολυηλεκτρολυτικού συμπολυμερούς κατά συστάδες QNPHOS-PEO (οι βαθμοί πολυμερισμού είναι $m=162$ και $n=334$) και β) Σχηματική αναπαράσταση των συμπλεγμάτων σύστασης QNPHOS-PEO:INS.



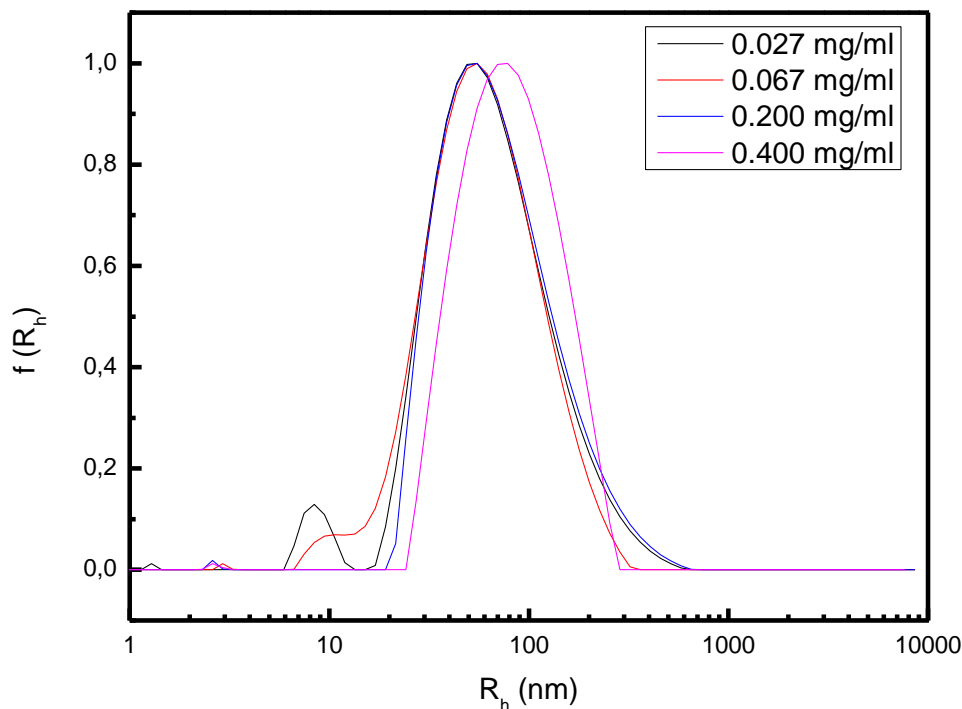
Σχήμα 47: α) Υδροδυναμική ακτίνα, R_h , και β) ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας 90° , I , ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της ινσουλίνης C_{INS} , για τα διαλύματα σύστασης QNPHOS-PEO:INS σε $pH=7.00$ και 0.01 M NaCl (μπλε σημεία) και σε $pH=7.40$ και 0.154 M NaCl (κόκκινα σημεία).



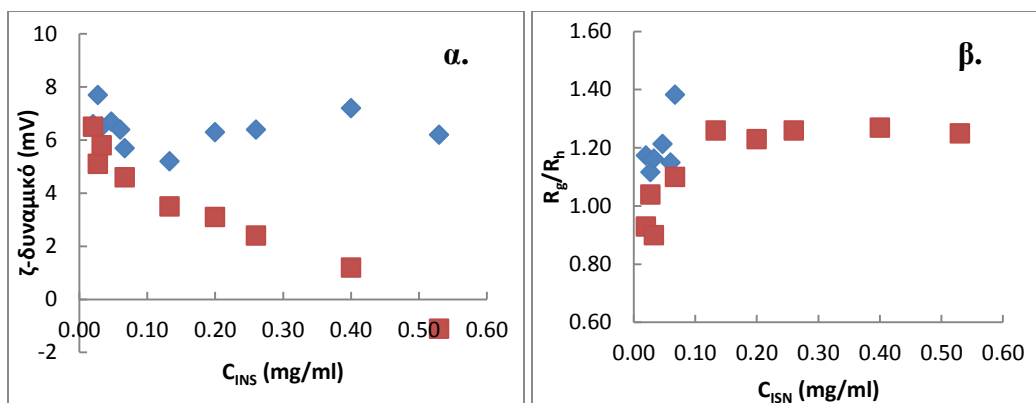
Σχήμα 48: Οι κατανομές της μεγέθους της INS α) σε $pH=7.00$ και 0.01 M και β) σε $pH=7.40$ και 0.154 M υπό γωνία σκέδασης $\theta=90^\circ$ και σε συγκέντρωση $c=5 \times 10^{-3}\text{ mg/ml}$. Οι κατανομές της υδροδυναμικής ακτίνας R_h αναλύθηκαν με το λογισμικό CONTIN.



Σχήμα 49: Οι κατανομές μεγέθους του QNPHOS-PEO σε pH=7.00 και 0.01 M και σε pH=7.40 και 0.154 M υπό γωνία σκέδασης $\theta=90^\circ$ και σε συγκέντρωση $c=5 \times 10^{-3}$ mg/ml. Οι κύριες κορυφές αντιστοιχούν σε συσσωματώματα αλυσίδων QNPHOS-PEO. Οι κατανομές της υδροδυναμικής ακτίνας R_h αναλύθηκαν με το λογισμικό CONTIN.



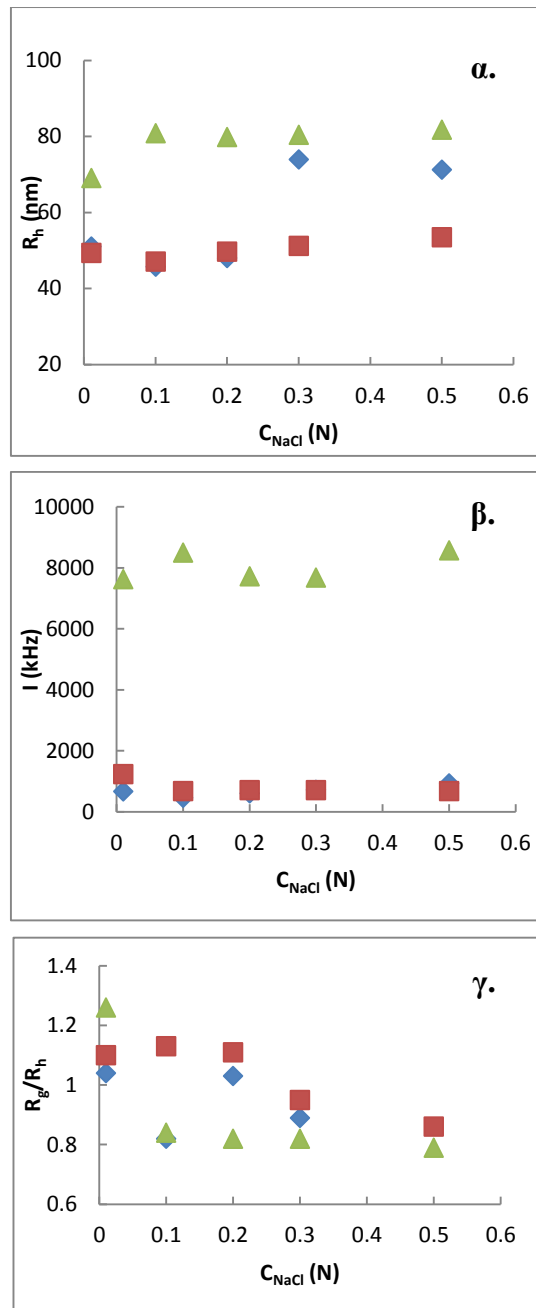
Σχήμα 50: Οι κατανομές των υδροδυναμικών ακτίνων των συμπλεγμάτων QNPHOS-PEO:INS που παρασκευάστηκαν σε pH=7.4 και I=0.154 M υπό γωνία σκέδασης $\theta=90^\circ$, ως συνάρτηση της C_{INS} (η λεζάντα δείχνει τη συγκέντρωση της ινσουλίνης που χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία των συμπλόκων). Οι κατανομές της υδροδυναμικής ακτίνας R_h αναλύθηκαν με το λογισμικό CONTIN.



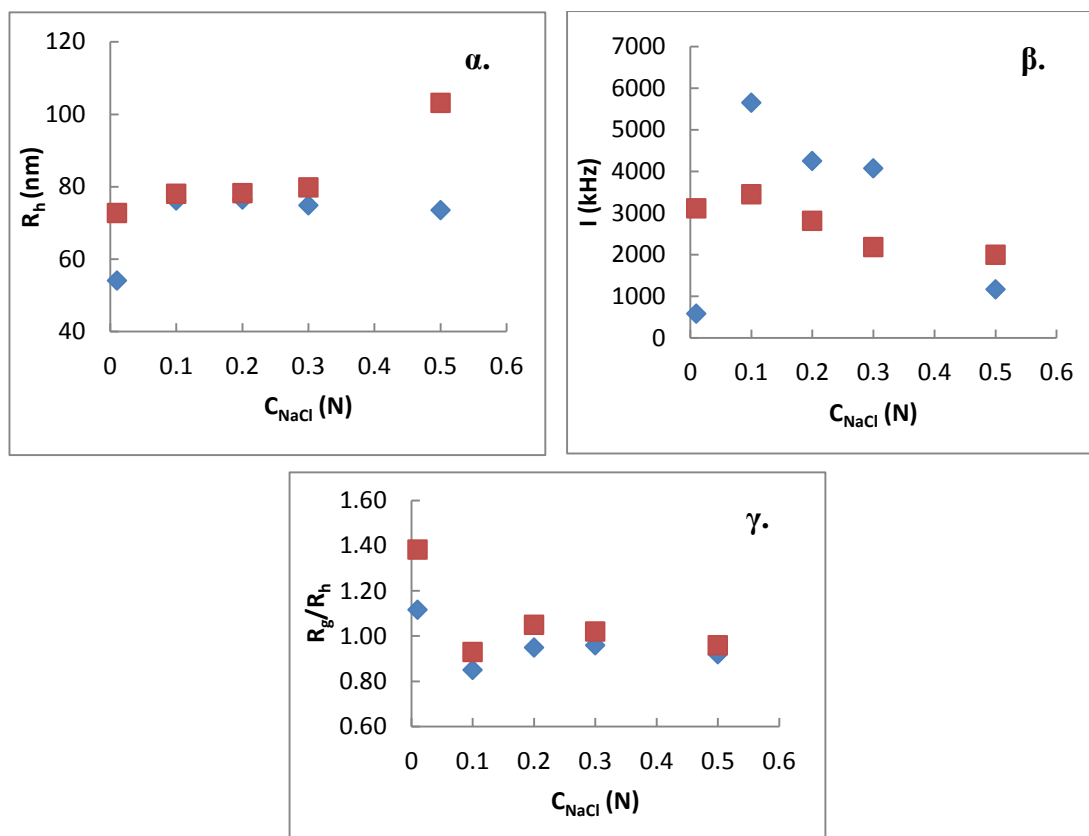
Σχήμα 51: α) ζ-δυναμικό και β) R_g/R_h ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της C_{INS} , για τα διαλύματα σύστασης QNPHOS-PEO:INS σε pH=7.00 και 0.01 M NaCl (μπλε σημεία) και σε pH=7.40 και 0.154 M NaCl (κόκκινα σημεία).

Στην περίπτωση των συμπλεγμάτων που παρασκευάστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα χαμηλής ιονικής ισχύος οι υδροδυναμικές ακτίνες των συμπλεγμάτων δεν διαφοροποιήθηκαν στατιστικά σημαντικά με την αύξηση της ιονικής ισχύος. Υπήρξε μία μικρή σταδιακή αύξηση του μεγέθους. Επαναλαμβάνεται ότι σε χαμηλές συγκεντρώσεις ινσουλίνης ο αριθμός των μορίων ινσουλίνης που αλληλεπιδρούν με κάθε πολυμερική αλυσίδα είναι σχετικά μικρός, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις ινσουλίνης τα συμπλέγματα τα οποία δημιουργούνται χαρακτηρίζονται από μεγάλο αριθμό μορίων πρωτεΐνης ανά αλυσίδα πολυηλεκτρολύτη. Η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας για τα συμπλέγματα που σχηματίστηκαν σε χαμηλή και υψηλή συγκέντρωση ινσουλίνης παρουσίασε μία διαφορετική συμπεριφορά (Σχήμα 52). Σε χαμηλές συγκεντρώσεις ινσουλίνης οι τιμές I_{90} αυξήθηκαν και έπειτα μειώθηκαν με την αύξηση της ιονικής ισχύος γεγονός που σημαίνει πως υπάρχει επιπλέον συσσωμάτωση των συμπλεγμάτων σε χαμηλή ιονική ισχύ (αλλά υψηλότερη σε σύγκριση με αυτή που χρησιμοποιήθηκε αρχικά για την δημιουργία των συμπλεγμάτων) και όταν αυξήθηκε η συγκέντρωση του άλατος η μάζα μειώθηκε ξανά.

Στην περίπτωση των συμπλεγμάτων που σχηματίστηκαν με υψηλότερη συγκέντρωση ινσουλίνης υπήρξε μία πολύ μικρή αλλαγή στην ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας και στη μάζα με την προσθήκη του άλατος, η οποία δείχνει μία πολύ μικρή μείωση της μάζας των συμπλεγμάτων. Οι τιμές R_g/R_h για τα συστήματα αυτά επιδεικνύουν μια μείωση και ένα plateau όταν $I > 0.1$ M, λαμβάνοντας την τιμή R_g/R_h 0.9-1.0, η οποία αποδεικνύει πιο συμπαγείς σφαιρικές δομές σε σύγκριση με τις αρχικές. Η παρατηρηθείσα συμπεριφορά σχετίζεται με τα φαινόμενα «κάλυψης»/εξασθένισης των φορτίων και έχουν ως αποτέλεσμα την εξασθένιση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων και την προαγωγή των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Εξαιτίας της υδρόφοβης φύσης των αλυσίδων του QNPHOS-PEO και της αρχικής κατάστασης συσσωμάτωσης, η προσθήκη άλατος έχει ως αποτέλεσμα δευτερογενή συσσωμάτωση των συμπλεγμάτων, που εξαρτάται από τις αρχικές συνθήκες της διαδικασίας σχηματισμού των συμπλεγμάτων. Η υδροδυναμική ακτίνα των συμπλεγμάτων, ως συνάρτηση της προσθήκης NaCl, παραμένει λίγο πολύ ανεπηρέαστη στην περίπτωση των συμπλεγμάτων τα οποία δημιουργήθηκαν στο PBS (Σχήμα 53). Το ίδιο πραγματοποιείται για τη μάζα των συμπλεγμάτων όπως υποδεικνύεται από τιμές I_{90} . Η μορφολογία των συμπλεγμάτων έδειξε κάποιες αλλαγές σε πιο σφαιρικές δομές που παρατηρήθηκαν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις άλατος, όπως αποδείχθηκε από τη μείωση των τιμών R_g/R_h . Για αυτά τα συστήματα αλλαγές σε καθορισμένες παραμέτρους είναι μικρές. Αυτό ίσως αποδεικνύει πως τα σύμπλοκα QNPHOS-PEO:INS τα οποία σχηματίστηκαν στο PBS είναι πιο σταθερά στις αλλαγές της ιονικής ισχύος και έχουν μία δομή πιο κοντινή στην ισορροπία.



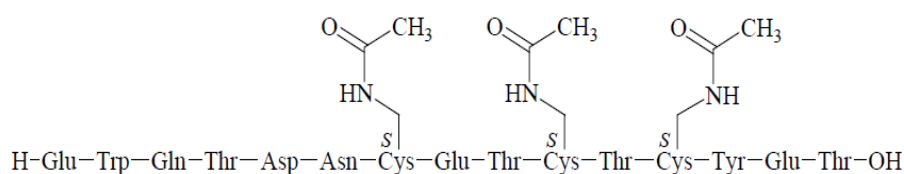
Σχήμα 52: α) Υδροδυναμική ακτίνα, R_h , β) ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας στους 90° , I , και γ) R_g/R_h , ως συνάρτηση της προστιθέμενης συγκέντρωσης NaCl σε αντιπροσωπευτικά διαλύματα, που αντιστοιχούν σε χαμηλές ($C_{INS}=0.027$ mg/ml – μπλε σημεία και $C_{INS}=0.067$ mg/ml – κόκκινα σημεία) και υψηλές ($C_{INS}=0.260$ mg/ml – πράσινα σημεία) C_{INS} , για τα διαλύματα σύστασης QNPPOS-PEO:INS σε pH=7.4 και I=0.154 M.



Σχήμα 53: α) Υδροδυναμική ακτίνα, R_h , β) ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας στους 90° , I , και γ) R_g/R_h , ως συνάρτηση της προστιθέμενης συγκέντρωσης NaCl σε αντιπροσωπευτικά διαλύματα, που αντιστοιχούν σε χαμηλές ($C_{INS}=0.027$ mg/ml – μπλε σημεία και $C_{INS}=0.067$ mg/ml – κόκκινα σημεία) και υψηλές ($C_{INS}=0.260$ mg/ml – πράσινα σημεία) C_{INS} , για τα διαλύματα σύστασης QNPHOS-PEO:INS σε pH=7.0 και $I=0.01$ M.

16. Αναπτύχθηκαν σφαιρικές 3D νανοδομές βασισμένες στο συμπολυμερές QNPHOS-PEO και την τιγαποσίδη (tigapotide - PCK) (η χημική δομή παρουσιάζεται στο Σχήμα 54), που είναι πεπτιδίο με κυτταροστατική και αντικαρκινική δράση. Ο εγκλωβισμός του σε νανοφορείς πραγματοποιήθηκε για τη μείωση των ανεπιθύμητων ενεργειών του και για στοχευμένη δράση στους καρκινικούς ιστούς. Αρχικά, το PCK χαρακτηρίστηκε φυσικοχημικά με Δυναμική Σκέδαση Φωτός και η υδροδυναμική του ακτίνα βρέθηκε ίση με περίπου 1 nm. Οι σφαιρικές 3D νανοδομές σχηματίστηκαν λόγω των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ της θετικά φορτισμένης πολυηλεκτρολυτικής συστάδας του συμπολυμερούς QNPHOS-PEO και των αρνητικά φορτισμένων του PCK (διαθέτει βασικά αμινοξέα). Η συγκέντρωση του συμπολυμερούς QNPHOS-PEO διατηρήθηκε σταθερή σε δύο σειρές υδατικών διαλυμάτων (χαμηλής ιοντικής ισχύος και pH=7.00 και σε ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο προσομοιάζει τις συνθήκες του αίματος, απόντων των κυττάρων του, αντίστοιχα), ενώ η συγκέντρωση του πεπτιδίου κυμαινόταν από 0.020 (η ελάχιστη) σε 0.530 (η μέγιστη) mg/ml. Χρησιμοποιήθηκαν εννέα διαφορετικές συγκεντρώσεις του πεπτιδίου, για το σχηματισμό των συμπλόκων (Σχήμα 55). Οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν για το φυσικοχημικό χαρακτηρισμό των σχηματιζόμενων νανοδομών ήταν η Δυναμική, η Στατική και η Ηλεκτροφορητική Σκέδαση του Φωτός. Η φθορισμομετρία χρησιμοποιήθηκε για να αποδείξει την ύπαρξη πολικού μικροπεριβάλλοντος στις σχηματισθείσες νανοδομές (Πίνακας 3). Οι νανοδομές που σχηματίστηκαν μέσα στο διάλυμα χαμηλής ιοντικής ισχύος ήταν της τάξεων των 30 nm. Τα σχηματιζόμενα σύμπλοκα μέσα στο ρυθμιστικό διάλυμα, που προσομοιάζει τις φυσιολογικές συνθήκες του ανθρώπινου οργανισμού, ήταν της τάξεως των

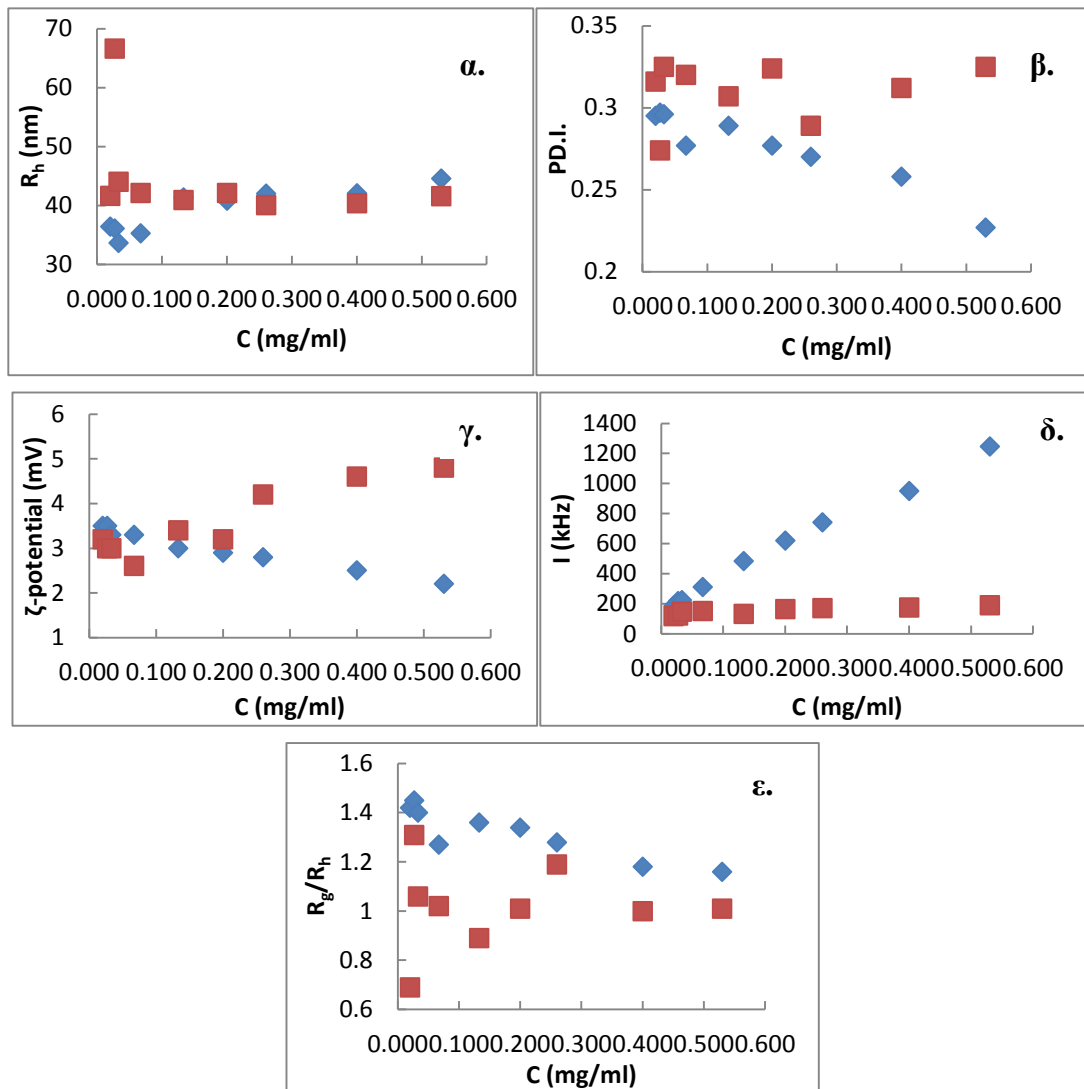
40 nm, και αυξανόμενης της συγκέντρωσης του PCK παρατηρήθηκε αύξηση της μάζας των συμπλόκων και αλλαγή των μορφολογικών χαρακτηριστικών των νανοδομών (Σχήμα 55). Επίσης, διαπιστώθηκε πως η αύξηση της ιοντικής ισχύος του διαλύματος σε 0.5 N δεν επηρέασε σημαντικά τη μάζα και τη μορφολογία των συμπλόκων, ενώ η υδροδυναμική τους ακτίνα παρέμεινε σταθερή, ιδιαίτερα για τις νανοδομές η σύμπλεξη των οποίων πραγματοποιήθηκε σε χαμηλή ιοντική ισχύ και σε pH=7.00 (Σχήματα 56 και 57). Η ανοιχτή δομή των συμπλόκων μετατράπηκε σε σφαιρική καθώς αυξανόταν η ιοντική ισχύς του διαλύματος, όπως έδειξαν οι μετρήσεις της Σκέδασης Φωτός (Σχήματα 52 και 53).



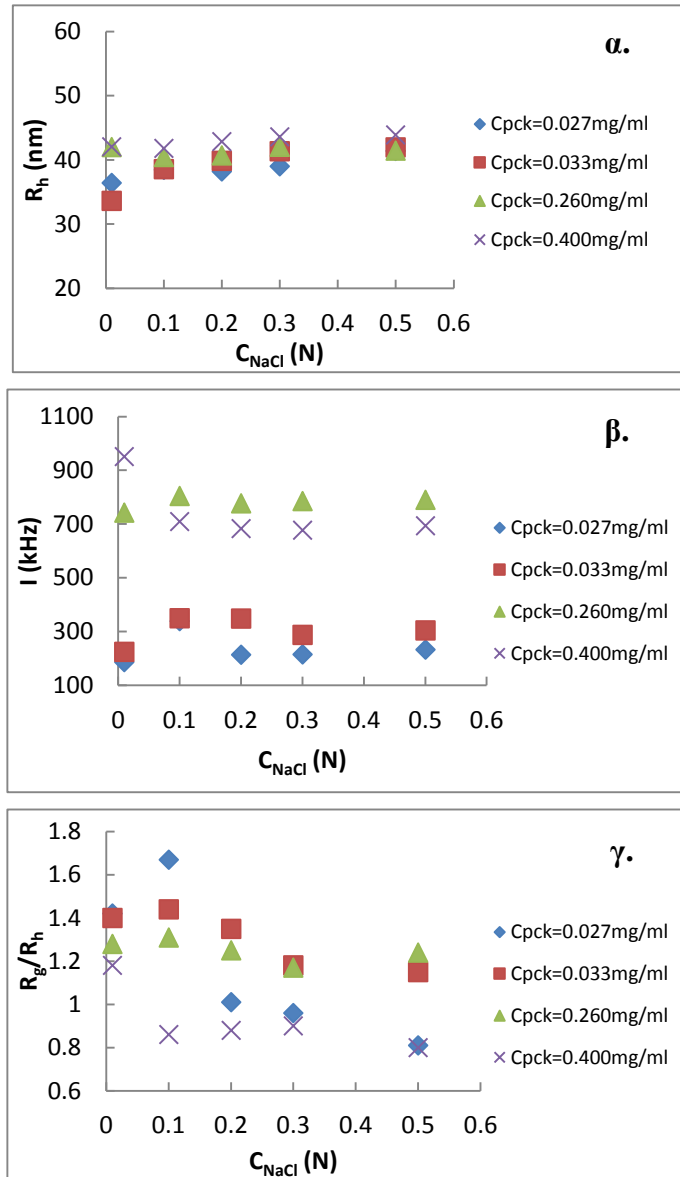
Σχήμα 54: Η μοριακή δομή της τιγαποσίδης (tigapotide - PCK 3145)

Πίνακας 3: Οι λόγοι των εντάσεων φθορισμού του πυρενίου I_1/I_3 (ενδεικτικός της μικροπολικότητας) και I_E/I_M (ενδεικτικός της μικρορευστότητας) για τα συστήματα QNPHOS-PEO:PCK3145.

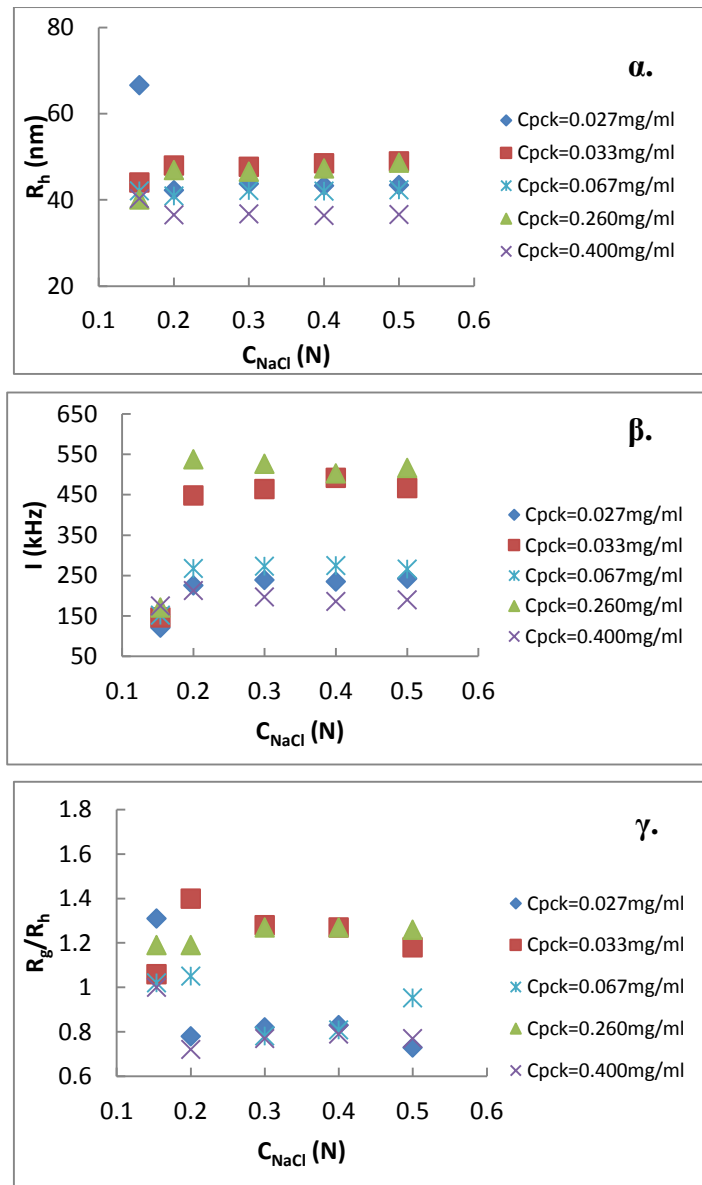
| C_{PCK3145} (mg/ml) | I=0.01 M (pH=7.00) | | I=0.154 M (pH=7.40) | |
|---------------------------------|--------------------|-----------|---------------------|-----------|
| | I_1/I_3 | I_E/I_M | I_1/I_3 | I_E/I_M |
| 0.027 | 1.78 | 0.49 | 1.78 | 0.24 |
| 0.033 | 1.78 | 0.22 | 1.73 | 0.49 |
| 0.067 | 1.60 | 0.68 | 1.67 | 0.47 |
| 0.260 | 1.94 | - | 1.63 | 0.66 |
| 0.400 | 1.73 | 0.57 | 1.71 | 0.70 |



Σχήμα 55: α) Υδροδυναμική ακτίνα, R_h , β) δείκτης πολυδιασποράς, (PDI), γ) ζ-δυναμικό, δ) ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας στις 90° , I , και ε) R_g/R_h ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του PCK3145, για τα διαλύματα του συστήματος QNPHOS-PEO:PCK3145 σε pH=7.00 και 0.01 M NaCl (μπλε σημεία) και σε pH=7.40 και 0.154 M NaCl (κόκκινα σημεία).



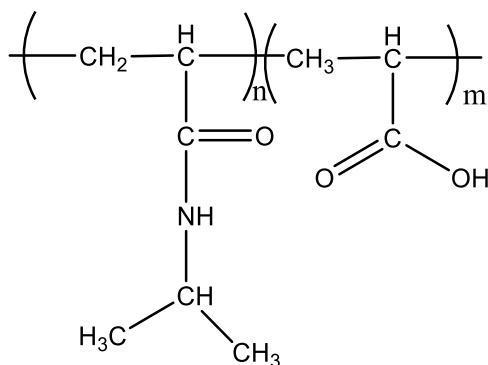
Σχήμα 56: α) Υδροδυναμική ακτίνα, R_h , β) ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας στις 90° , I , και γ) R_g/R_h , ως συνάρτηση της συγκέντρωσης $NaCl$ σε αντιπροσωπευτικά διαλύματα, που αντιστοιχούν σε χαμηλή και υψηλή $C_{PCK3145}$, των συστημάτων QNPHOS-PEO:PCK3145 σε $pH=7.00$.



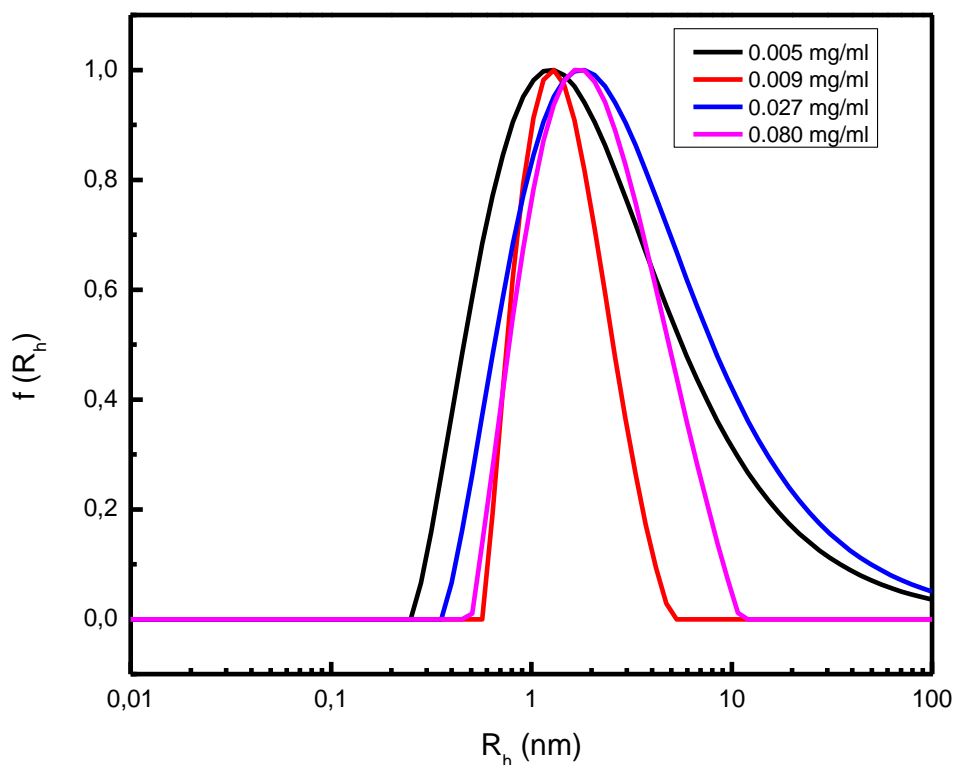
Σχήμα 57: α) Υδροδυναμική ακτίνα, R_h , β) ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας στις 90° , I , και γ) R_g/R_h , ως συνάρτηση της συγκέντρωσης $NaCl$ σε αντιπροσωπευτικά διαλύματα, που αντιστοιχούν σε χαμηλή και υψηλή $C_{PCK3145}$, των συστημάτων QNPHOS-PEO:PCK3145 σε $pH=7.40$.

17. Αναπτύχθηκαν σφαιρικές 3D νανοδομές βασισμένες στο συμπολυμερές PNIPAM-b-PAA (Σχήμα 58) και την πρωτεΐνη λυσοζύμη, η οποία οδηγεί στη λύση των βακτηριακών τοιχωμάτων υδρολύοντας την πεπτιδογλυκάνη που υπάρχει στο κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων. Οι σφαιρικές 3D νανοδομές σχηματίστηκαν λόγω των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ της αρνητικά φορτισμένης πολυηλεκτρολυτικής συστάδας του PAA και των θετικά φορτισμένων της λυσοζύμης (διαθέτει όξινα αμινοξέα). Η συγκέντρωση του συμπολυμερούς PNIPAM-b-PAA διατηρήθηκε σταθερή σε υδατικό διάλυμα χαμηλής ιοντικής ισχύος με $pH=7.00$ ενώ η συγκέντρωση της λυσοζύμης κυμαινόταν από 0.004 (η ελάχιστη) σε 0.080 (η μέγιστη) mg/ml . Χρησιμοποιήθηκαν εννέα διαφορετικές συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης, για το σχηματισμό των συμπλόκων. Οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν για το φυσικοχημικό χαρακτηρισμό των σχηματιζόμενων νανοδομών ήταν η Δυναμική, η Στατική και η Ηλεκτροφορητική Σκέδαση του Φωτός. Αρχικά, προσδιορίστηκαν τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του συμπολυμερούς κατά συστάδες και

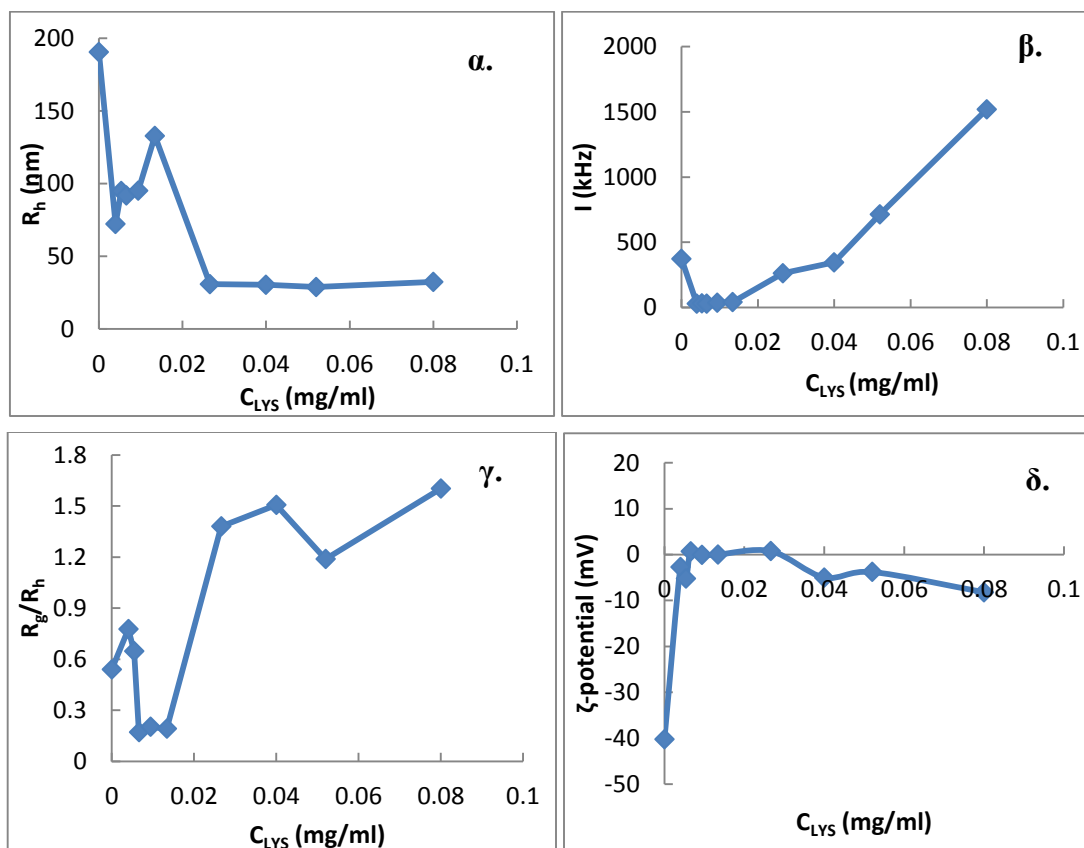
βρέθηκε πως η υδροδυναμική ακτίνα (R_h) των σχηματιζόμενων δομών ήταν περίπου 190 nm (Σχήματα 59 και 60). Η μορφολογία των δομών που σχηματίζει ο πολυηλεκτρολύτης στο υδατικό μέσο είναι ανάλογη συμπαγούς σφαίρας. Οι νανοδομές που σχηματίστηκαν στο διάλυμα χαμηλής ιοντικής ισχύος ήταν της τάξεων των 70 nm σε χαμηλές συγκεντρώσεις λυσοζύμης, αύξηση της R_h στο ισοδύναμο σημείο στα 130 nm και εν συνεχεία μείωση του μεγέθους των νανοδομών στα 30 nm στις υψηλότερες συγκεντρώσεις της λυσοζύμης. Η αύξηση της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας καθώς και η μείωση του δείκτη πολυδιασποράς αποδεικνύουν τη σύμπλεξη της λυσοζύμης με του συμπολυμερούς κατά συστάδες, αποτέλεσμα της οποίας είναι και η αλλαγή της μορφολογίας των σχηματιζόμενων νανοδομών με τη σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης. Το ισχυρά αρνητικό ζ-δυναμικό του συμπολυμερούς PNIPAM-b-PAA μετατοπίστηκε προς λιγότερο αρνητικές τιμές μετά τη σύμπλεξη με τη λυσοζύμη. Επίσης, διαπιστώθηκε πως η αύξηση της ιοντικής ισχύος του διαλύματος σε 0.5 N επηρέασε σημαντικά το μέγεθος (σημαντική αύξηση της υδροδυναμικής ακτίνας), τη μάζα και τη μορφολογία των συμπλόκων (Σχήμα 61). Επιπρόσθετα, λαμβάνοντας υπόψη ότι το συμπολυμερές κατά συστάδες είναι θερμοευαίσθητο στη θερμοκρασία των 32 °C, πραγματοποιήθηκαν πειράματα μελέτης των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των σχηματιζόμενων νανοδομών μεταβάλλοντας της θερμοκρασία σταδιακά από τους 20 °C→25 °C→28 °C→32 °C→35 °C→40 °C→45 °C (Σχήματα 62 και 63). Όσον αφορά τους κενούς πολυμερικούς νανοφορείς, το μέγεθός τους μειώθηκε με τη θέρμανση στους 45 °C (Σχήμα 64). Αντίθετα, για τις 3D νανοδομές δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή του μεγέθους τους με την θέρμανση. Η μάζα των νανοδομών δεν επηρέασε τη μάζα τους. Κλείνοντας, η σφαιρική δομή των συμπλόκων μετατράπηκε σε ανοικτή καθώς αυξανόταν η θερμοκρασία του διαλύματος.



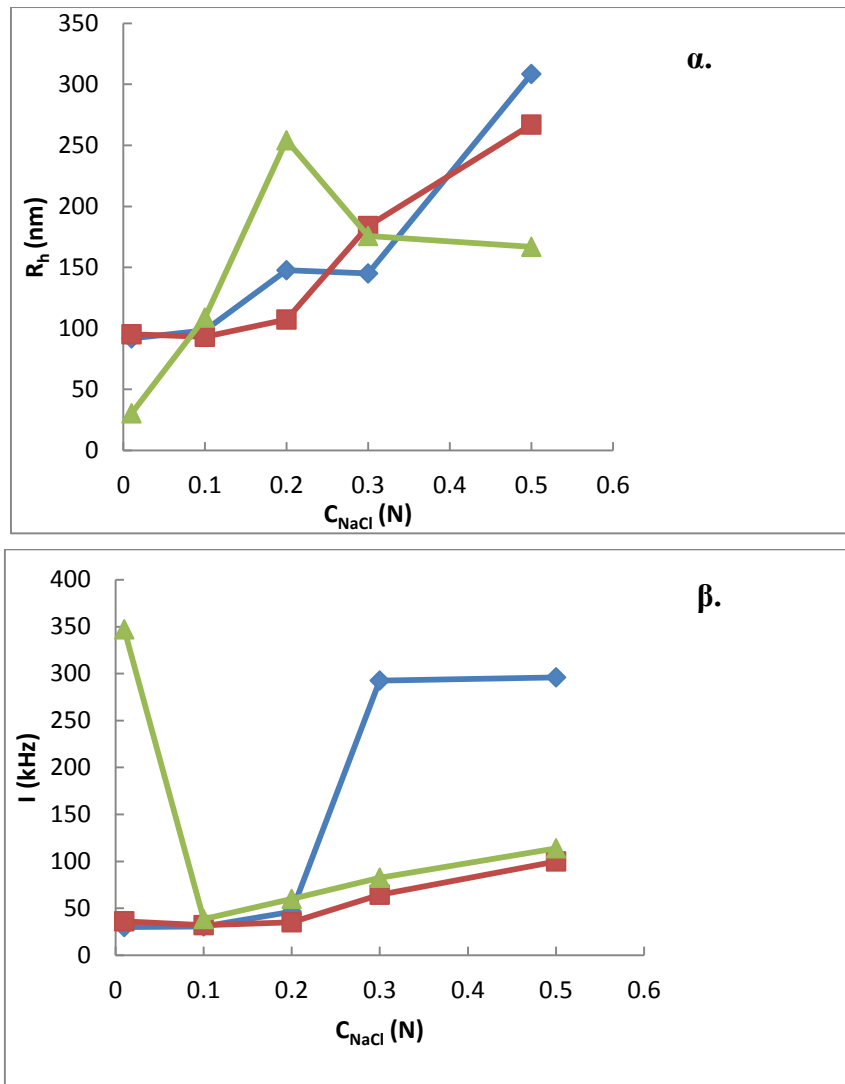
Σχήμα 58: Η μοριακή δομή του πολυηλεκτρολυτικού συμπολυμερούς κατά συστάδες PNIPAM-b-PAA (30% PAA, $M_w=7,800$).



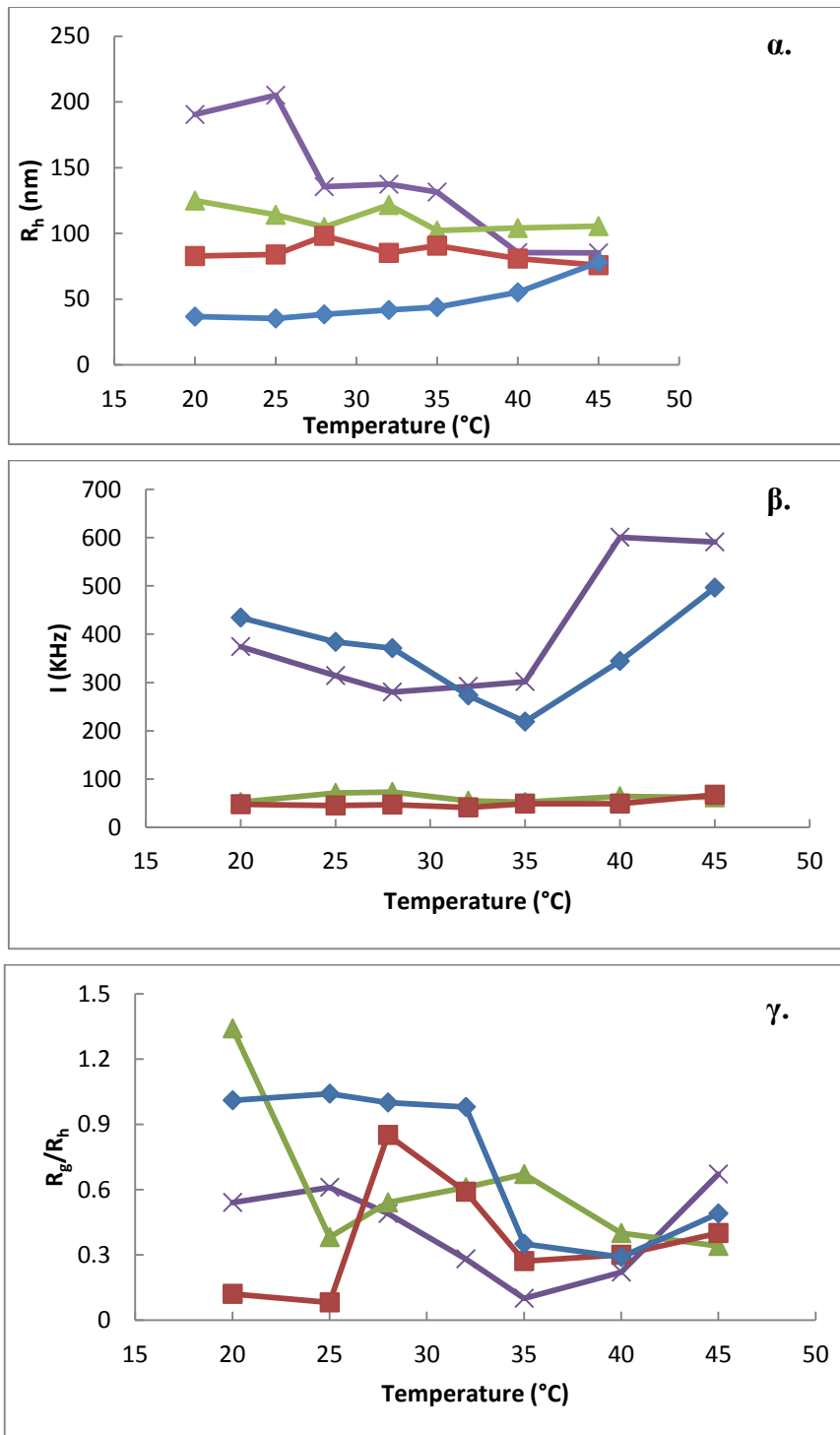
Σχήμα 59: Διαγράμματα κατανομής μεγέθους για τα συστήματα PNIPAM-b-PAA:Lys.



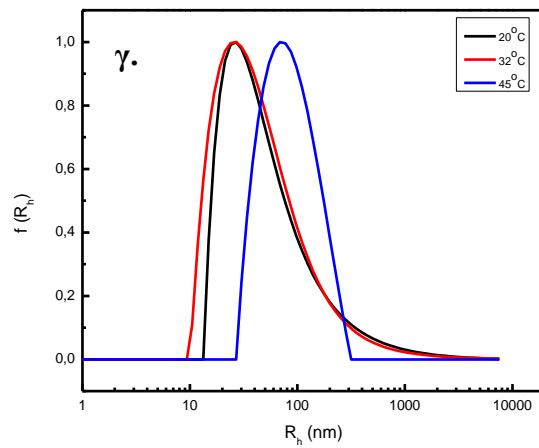
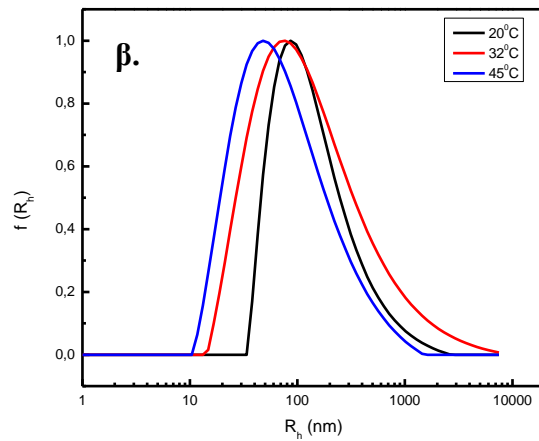
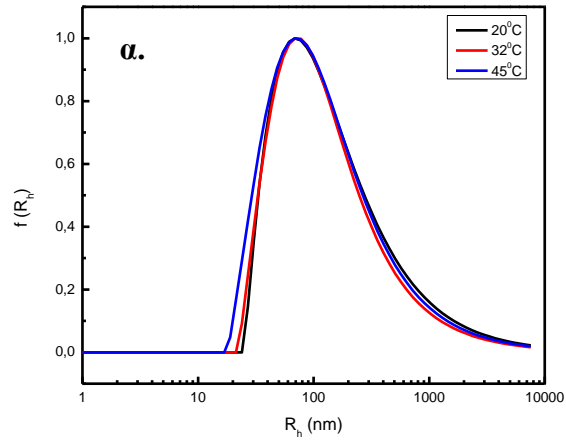
Σχήμα 60: α) Υδροδυναμική ακτίνα, R_h , β) ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας 90° , I , γ) R_g/R_h , και δ) ζ-δυναμικό ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της λυσοζύμης C_{LYS} , για τα υδατικά διαλύματα των συστημάτων PNIPAM-b-PAA:Lys σε $pH=7.00$ και 0.01 M NaCl . Οι γραμμές είναι οδηγοί των τάσεων στη μεταβολή των μεγεθών.



Σχήμα 61: α) Υδροδυναμική ακτίνα, R_h , και β) ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας στις 90° , I , ως συνάρτηση της προστεθείσας συγκέντρωσης NaCl για τα αντιπροσωπευτικά διαλύματα, που αντιστοιχούν σε χαμηλές και υψηλές συγκεντρώσεις λυσοζύμης C_{LYS} , των συστημάτων PNIPAM-b-PAA:LYS που παρασκευάστηκαν σε pH=7.00 και 0.01 M NaCl ($C_{LYS}=0.005$ mg/ml - μπλε γραμμή, $C_{LYS}=0.009$ mg/ml - κόκκινη γραμμή και $C_{LYS}=0.040$ mg/ml - πράσινη γραμμή). Οι γραμμές είναι οδηγοί των τάσεων στη μεταβολή των μεγεθών.



Σχήμα 62: α) Υδροδυναμική ακτίνα, R_h , β) ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας στις 90° , I , και γ) R_g/R_h ως συνάρτηση της μεταβολής της θερμοκρασίας, που αντιστοιχούν σε χαμηλή και υψηλή C_{LYS} , για τα διαλύματα των συστημάτων PNIPAM-b-PAA:LYS που παρασκευάστηκαν σε $\text{pH}=7.00$ και 0.01 M NaCl . ($C_{\text{LYS}}=0.000 \text{ mg/ml}$ - μωβ γραμμή, $C_{\text{LYS}}=0.005 \text{ mg/ml}$ - πράσινη γραμμή, $C_{\text{LYS}}=0.009 \text{ mg/ml}$ - κόκκινη γραμμή και $C_{\text{LYS}}=0.040 \text{ mg/ml}$ - μπλε γραμμή). Οι γραμμές είναι οδηγοί των τάσεων στη μεταβολή των μεγεθών.



Σχήμα 63: Η κατανομή μεγέθους σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία, που αντιστοιχεί σε χαμηλή και υψηλή συγκέντρωση λυσοζύμης C_{LYS} για τα διαλύματα PNIPAM-b-PAA:Lys (α. $C_{LYS}=0.005$ mg/ml, β. $C_{LYS}=0.009$ mg/ml και γ. $C_{LYS}=0.040$ mg/ml).