



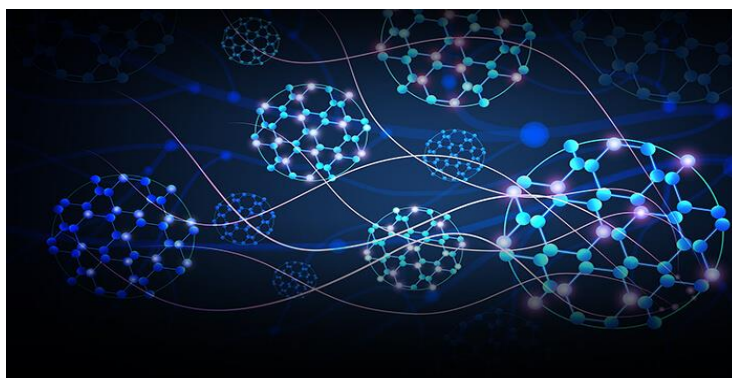
Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Χημείας,
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

&

Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών,
Αθήνα

Ινστιτούτο Βιοϊατρικών Ερευνών, IMBB-ΙΤΕ, Ιωάννινα
Τμήμα Μηχανικών Επιστήμης των Υλικών, Πανεπιστήμιο
Ιωαννίνων

**Ανάπτυξη Νέων Υδατικών Νανοσωματιδίων
Συζυγιακών Πολυμερών για Βιοαπεικόνιση
ως Ικνηθέτες Φθορισμού**



**ΠΑΥΛΟΥ ΑΡΙΣΤΕΑ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

Μεταπτυχιακή Διατριβή
Ιωάννινα-Αθήνα
2021

Αφιερώνεται στην
Οικογένειά μου

ΠΡΟΛΟΓΟΣ- ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία έγινε για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης (Μ. Δ. Ε.) με κατεύθυνση Συνθετική Χημεία, Βιοχημεία και Βιοδραστικές Ενώσεις και έχει τίτλο «Ανάπτυξη Νέων Υδατικών Νανοσωματιδίων Συζυγιακών Πολυμερών για Βιοαπεικόνιση ως Ιχνηθέτες Φθορισμού». Σε αυτό το σημείο πρέπει να σημειωθεί ότι η εκπόνηση της εργασίας αυτής έγινε στο Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών στην Αθήνα, στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, στο Ινστιτούτο Βιοϊατρικών Ερευνών (IMBB) στα Ιωάννινα του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας (FORTH) και στο Τμήμα Μηχανικών Επιστήμης Υλικών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Αρχικά, θέλω να ξεκινήσω ευχαριστώντας από τα βάθη της καρδιάς μου τον Μιχάλη Σίσκο, καθηγητή Οργανικής Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και επιβλέπων καθηγητή μου, τόσο σε προπτυχιακό όσο και σε μεταπτυχιακό επίπεδο, για την άψογη συνεργασία μας όλα αυτά τα χρόνια. Ιδιαίτερα, για το γεγονός ότι με υποστήριξε και με βοήθησε να αναπτύξω μία νέα συνεργασία με το Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών. Καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της μεταπτυχιακής διπλωματικής μου διατριβής, ήταν δίπλα μου με συνεχή επιστημονική καθοδήγηση, εύστοχες και εποικοδομητικές παρατηρήσεις του, την επίλυση και αποσαφήνιση διαφόρων σημείων, γεγονός που έπαιξε καθοριστικό ρόλο στην μέχρι τώρα πορεία μου και την εξέλιξη μου ως επιστήμονα. Με δίδαξε σημαντικά πράγματα στον τομέα της επιστήμης και της έρευνας και υπήρξε ιδιαίτερα υποστηρικτικός και πρόθυμος να με βοηθήσει όταν το χρειαζόμουν. Επίσης, νιώθω ευγνωμοσύνη που είχα έναν τόσο αξιόλογο μέντορα αυτά τα χρόνια και πάνω απ' όλα καλό άνθρωπο.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Χώχο Χρήστο που μου έδωσε την ευκαιρία να αναπτύξουμε αυτήν την καρποφόρα συνεργασία, για την υπόδειξη του θέματος καθώς και για την εμπιστοσύνη του από την πρώτη κιόλας στιγμή στο νέο αυτό πεδίο έρευνας με την ευκαιρία να μάθω και να εξελιχθώ. Η συνεχής βοήθειά του, οι γνώσεις που μου παρείχε και όλες οι ευκαιρίες που μου προσέφερε ήταν κρίσιμες καθ' όλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας και αποτέλεσαν ένα από τα καθοριστικά στάδια στη μέχρι στιγμής πορεία μου. Μου άνοιξε νέους ορίζοντες σε ένα καινοτόμο και ανελλισσόμενο κλάδο της επιστήμης με εξαιρετικές προοπτικές για την προώθηση της υγείας μέσω της επιστήμης της Νανοτεχνολογίας συνδυάζοντας πολλούς διαφορετικούς τομείς της έρευνας.

Επιπρόσθετα, θέλω να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον καθηγητή του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης των Υλικών, Αυγερόπουλο Απόστολο για όλες τις χρήσιμες συμβουλές και οδηγίες κατά τη διάρκεια εκπόνησης της μεταπτυχιακής διπλωματικής μου εργασίας.

Σε αυτό το σημείο, θα ήθελα να ευχαριστήσω ολόψυχα τους καθηγητές και υπεύθυνους ερευνητές του εργαστηρίου τους, στο Ινστιτούτο Βιοϊατρικών Ερευνών, Φώτη Θεόδωρο και Murphy Carol που με δέχτηκαν στο εργαστήριό τους, έτσι ώστε να εκπονήσω τα βιολογικά πειράματα της εργασίας μου και από την αρχή με έκαναν να νιώσω μέλος της ερευνητικής τους ομάδας. Ιδιαίτερως, θα ήθελα να εκφράσω από καρδιάς την ευγνωμοσύνη μου και τις ευχαριστίες μου στην Murphy Carol, η οποία βρισκόταν πάντα δίπλα μου σε όποια απορία υπήρξε, αλλά και στην επίλυση πολλών ζητημάτων, καθώς και στις γνώσεις που μου μετέδωσε πάνω στην βιολογία και βιοχημεία, αλλά και στην εκπαίδευση πάνω σε πολλές τεχνικές και μεθοδολογίες, οι οποίες ήταν κρίσιμες για την μέχρι στιγμής επιστημονική μου πορεία. Εύχομαι οι επιστημονικοί μας δρόμοι να ξανασυναντηθούν και να έχουμε και άλλες μελλοντικές συνεργασίες, έχοντας τις καλύτερες εντυπώσεις και αναμνήσεις απ' αυτήν την συνεργασία.

Θα ήταν παράλειψη μου να μην ευχαριστήσω ιδιαίτερως τις μεταδιδακτορικές συνεργάτιδες του εργαστηρίου του Χ. Χώχου, πρωτίστως την Νέγκα Αλκμήνη και έπειτα την Κοράλλη Παναγιώτα αλλά και την τότε μεταπτυχιακή φοιτήτρια Βαγιάκη Λήδα- Ευμορφία, με τις οποίες η συνεργασία μου ήταν άριστη, φιλική και ιδιαίτερα παραγωγική. Κυρίως, η Αλκμήνη υπήρξε ιδιαίτερα υποστηρικτική και κατατοπιστική όλο αυτό το διάστημα. Ευχαριστώ και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου αυτού που γνώρισα στην πορεία και συνεργαστήκαμε άψογα (Γουλιελμάκη Μαρία, Σχίζα Ανδριάννα, Clement Gideon).

Επιπλέον, από το εργαστήριο της C. Murphy και του Θ. Φώτη, τον μεταδιδακτορικό συνεργάτη, Κατσούρα Αθανάσιο, αλλά και την μεταδιδακτορική συνεργάτιδα Μάρκου Μαρία για την εμπιστοσύνη και την αμέριστη βοήθεια τους καθώς και για την εκπαίδευση σε κάποια από τα βιολογικά πειράματα. Για την υπέροχη συνεργασία, το όμορφο κλίμα και την καθοδήγηση στον ενδιαφέρον κόσμο των βιολογικών πειραμάτων, ευχαριστώ και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου αυτού (Σοφία Μπέλλου, Μαρία Χατζηαθανασιάδου, Έλενα Ρακοβολιού, Μανώλης Ιακωβίδης).

Στο σημείο αυτό, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά το εργαστήριο Κεραμικών και Σύνθετων Υλικών και πιο συγκεκριμένα την ομάδα των Φυλλόμορφων και Νανοπορωδών Υλικών του καθηγητή Γουρνή Δημήτρη και τον διδακτορικό Χαλμπέ Νικόλαο για τις εικόνες AFM που μου παρείχαν στα δείγματα της παρούσας εργασίας. Επίσης, και το εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Αναπληρωτή Καθηγητή Τζάκου

Ανδρέα, ο οποίος μου έδωσε άδεια να χρησιμοποιήσω το φθορισμόμετρο που διαθέτει για τις απαιτούμενες μετρήσεις που τυχόν χρειάστηκα.

Τελειώνοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους φίλους μου για την στήριξη και την ενθάρρυνση που μου παρείχαν σε όλο αυτό το χρονικό διάστημα εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω περισσότερο απ' όλους, την οικογένειά μου, για την οικονομική και ψυχολογική υποστήριξη που μου παρείχαν όλο αυτό το διάστημα, καθώς και για την ενθάρρυνση που μου παρέχουν σε κάθε βήμα της ζωής μου.

Πίνακας περιεχομένων

Πίνακας περιεχομένων	
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
Κεφάλαιο 1:.....	1
1.1.: Γενικές πληροφορίες.....	1
1.2.: Σκοπός της παρούσας Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας	2
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	4
Κεφάλαιο 2:.....	4
2.1: Καρκίνος και Στατιστικά	4
2.2: Φαρμακευτικές αγωγές και θεραπείες καρκίνου μέχρι σήμερα	5
2.3: Μικροπεριβάλλον του Καρκίνου (Tumor Microenvironment, TME).....	7
2.4: Φαινόμενο Ενισχυμένης Διαπερατότητας και Κατακράτησης (Enhanced Permeability and Retention Effect, EPR effect) ¹¹⁻¹⁴	9
2.5.1: Θεραπευτικά ή Θεραπογνωστικά (Theranostics)	11
2.5.2: Νανοτεχνολογία και Νανοϊατρική.....	11
2.6.:Βιοαπεικόνιση και Θεραπεία ^{19,20}	13
Κεφάλαιο 3:.....	15
3.1.1.: Πολυμερή	15
3.1.2.: Μονωτές και Αγωγοί	15
3.1.2.1.: Ενέργεια και επίπεδο Fermi ²⁹	16
3.1.2.2.:Θεωρία Ζωνών ²⁸	17
3.1.3.: Ημιαγώγιμα Πολυμερή	18
3.2. Φωτονικά Υλικά και ιδιότητες	21
3.2.1.: Συζυγιακά Πολυμερή ^{27,28}	22
3.2.2.: Φαινόμενο Δότη-Δέκτη (Donor-Acceptor, D-A).....	22
3.2.3.: Νανოსωματίδια Συζυγιακών Πολυμερών ^{19,20,38}	23
3.3.: Βιοαπεικόνιση και Θεραπεία μέσω CPNs ²⁰	25
3.3.1.: Απεικόνιση μέσω φθορισμού	25
3.3.2.: Φωτοακουστική απεικόνιση	25
3.3.3.: Απεικόνιση μέσω Raman.....	26
3.3.4.: Φωτοδυναμική θεραπεία	26
3.4.5.: Φωτοθερμική θεραπεία.....	27
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	29
Κεφάλαιο 4: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ	29
4.1.:Σύνθεση Συζυγιακών Πολυμερών	29
4.1.2.: Χαρακτηρισμός Συζυγιακών Πολυμερών.....	31

4.1.2.1: Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance ή NMR)	32
4.1.2.2: Χρωματογραφία Διαχωρισμού μέσω Πηκτής (Gel Permeation Chromatography, GPC).....	34
4.2.:Σύνθεση Νανοσωματιδίων Συζυγιακών Πολυμερών (Conjugated Polymer Nanoparticles, CPNPs ή CPNs)	37
4.2.1.:Χαρακτηρισμός Νανοσωματιδίων Συζυγιακών Πολυμερών	38
4.2.1.2.: Δυναμική Σκέδαση Φωτός (Density Light Scattering, DLS).....	39
4.2.1.3.: Δυναμικό zeta, ζ (zeta potential).....	40
4.2.1.4.: Μικροσκοπία Ατομικής Δύναμης (Atomic Force Microscopy, AFM).....	42
4.3.: Φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού UV-Vis.....	43
4.4.: Φασματοσκοπία Φθορισμού και Προσδιορισμός Κβαντικών Αποδόσεων μέσω Φθορισμού	45
4.5.: In vitro εφαρμογή σε καρκινικά και υγιή επιθηλιακά κύτταρα.....	47
4.5.1.: Μέθοδος Ζωντανής Απεικόνισης IncuCyte®	48
4.5.2.: Συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού (Confocal Microscopy)	49
Κεφάλαιο 5: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	51
5.1. Οργανολογία	51
5.2.: Σύνθεση Συζυγιακών Πολυμερών μέσω της αντίδρασης Stille και καθαρισμός τους μέσω εκχύλισης Soxhlet	51
5.3.:Σύνθεση Νανοσωματιδίων Συζυγιακών Πολυμερών	54
5.3.1.:Μέσω νανοκαταβύθισης (nanoprecipitation).....	54
5.3.2.:Μέσω εγκλωβισμό (encapsulation)	54
5.4.: Μικροσκοπία AFM.....	55
5.5.: Υπολογισμός Κβαντικών Αποδόσεων (Quantum Yields, QY).....	55
5.6.: Καλλιέργεια καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων παχέος εντέρου HCT-116	56
5.7.: Απομόνωση ενδοθηλιακών κυττάρων από φλέβα ομφάλιου λώρου (Huvac)	56
5.8.: Καλλιέργεια ενδοθηλιακών κυττάρων απομονωμένων από φλέβα ομφάλιου λώρου (Huvac)	57
5.9.: Κυτταροτοξικότητα κυττάρων μέσω της μεθόδου του IncuCyte®	57
5.10.: Ανοσοφθορισμός.....	58
5.11.: Ζωντανή Κυτταρική Απεικόνιση με NPs.....	59
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	61
Κεφάλαιο 6: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ	61
6.1.: Χαρακτηρισμός των συντιθέμενων ενώσεων	61
6.1.1.: Ανάλυση Φάσματος ¹ H-NMR & ¹³ C-NMR	61
6.1.2.: Φάσματα Χρωματογραφίας Διαχωρισμού μέσω Πηκτής (GPC)	69

6.1.3.:Φασματοσκοπία UV-Vis, Φθορισμού & Κβαντικές Αποδόσεις (QY) των συντιθέμενων CPs σε διαλύτη THF	71
6.2.: Χαρακτηρισμός των nanoprecipitated CPNs.....	75
6.2.1.:DLS & zeta potential κάποιων παρτίδων των nanoprecipitated CPNs	75
6.2.2.:Φασματοσκοπία UV-Vis, Φθορισμού & Κβαντικές Αποδόσεις (QY) των νανοκαταβυθιζόμενων NPs.....	83
6.2.4.: Χαρακτηρισμός μέσω AFM των nanoprecipitated NPs	87
6.3.: Χαρακτηρισμός των encapsulated NPs	91
6.3.1.: DLS & Zeta potential των encapsulated NPs	91
6.3.2.:Φασματοσκοπία UV-Vis & φθορισμού των encapsulated NPs	93
6.4.: Αποτελέσματα πειραμάτων in vitro.....	98
6.4.1.: Κυτταροτοξικότητα των 2 κυτταρικών σειρών με τα NPs (από νανοκαταβύθιση) μέσω της μεθόδου του IncuCyte®	98
6.4.2.: Απεικόνιση των φθοριζόντων NPs μέσω νανοκαταβύθισης σε κύτταρα HCT-116 & HUVECs.....	110
6.4.3.1.: Ανοσοφθορισμός με LAMP1 & CD63 των CPNs σε HCT-116 ύστερα από 24h επώασης	116
6.4.3.2.: Ζωντανή Συνεστιακή Μικροσκοπία Φθορισμού HCT-116 με χρήση χρωστικής Lucifer Yellow και τα NPs μέσω νανοκαταβύθισης.....	120
6.4.3.3.: Χρονικός προσδιορισμός εισαγωγής των NPs μέσω νανοκαταβύθισης στα κύτταρα HCT-116.....	123
6.4.3.4.: Έκκριση (Secretion)	127
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ & ΜΕΛΕΤΗ	133
7.1.: Υπολογιστική Χημεία της Παρούσας Διπλωματικής Εργασίας.....	133
7.2.: Θεωρητική Προσέγγιση του φάσματος UV-Vis των ενώσεων cc150-151-153 με τις μεθόδους ZINDO, TD-B3LYP & TD-PBE0.....	133
7.3.:Θεωρητική προσέγγιση με Υπολογισμό Φυσικών Τροχιακών Δεσμού (NBO)	142
ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	148
Κεφάλαιο 8: Σύνοψη Αποτελεσμάτων και Συμπεράσματα	148
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	150
ABSTRACT.....	151
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	153
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	159
Παράρτημα 1:.....	159
Παράρτημα 2:.....	162
Παράρτημα 3:.....	169
Παράρτημα 4:.....	170
ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΩΝ.....	179

ΣΥΖΥΓΙΑΚΑ ΠΟΛΥΜΕΡΗ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΣΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΜΔΕ.....	181
---	-----

Κεφάλαιο 1:

1.1.: Γενικές πληροφορίες

Τα τελευταία χρόνια, όπου η επιστήμη και η τεχνολογία αναπτύσσονται ραγδαία, καθίσταται πιο κρίσιμη η ανακάλυψη νέων, καλύτερων θεραπειών για θανάσιμες ασθένειες, όπως ο καρκίνος. Ο καρκίνος είναι μία θανάσιμη κατά πολλές περιπτώσεις ασθένεια, στην οποία έχουμε τη μη φυσιολογική και αυξανόμενη κυτταρική ανάπτυξη και διαίρεση. Τα καρκινικά κύτταρα αναπτύσσονται ανεξέλεγκτα και σχηματίζουν ένα μórφωμα γνωστό ως κακοήγη «όγκο» ή «νεόπλασμα». Ο όγκος γίνεται προοδευτικά μεγαλύτερος και μπορεί να εισβάλει σε γειτονικούς ιστούς, καταστρέφοντας υγιείς ιστούς και όργανα. Τα καρκινικά κύτταρα μπορούν επίσης να εγκαταλείψουν τον όγκο και να μεταφερθούν σε άλλες περιοχές του σώματος. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως «μετάσταση», και οι καρκίνοι που προκύπτουν είναι γνωστοί ως «μεταστατικοί» διότι διαφοροποιούνται από τον πρωτογενή ή «κύριο» καρκίνο. Μια εξαίρεση αποτελεί η λευχαιμία, η οποία είναι καρκίνος των αιμοποιητικών ιστών. Ο καρκίνος αυτός δε διαμορφώνει όγκους αλλά δημιουργεί ανώμαλα αιματικά κύτταρα που κινούνται στο κυκλοφορικό σύστημα. Η λευχαιμία είναι τόσο σοβαρή όσο και οι καρκίνοι που σχηματίζουν όγκους. Ο καρκίνος είναι η δεύτερη αιτία θανάτου σε πάρα πολλές χώρες και για το λόγο αυτό, η ανάγκη για εύρεση θεραπείας είναι ιδιαίτερος σημαντική.¹

Πολλοί επιστήμονες με την πάροδο των χρόνων έχουν εξετάσει την ασθένεια αυτή από πολλές σκοπιές μιας και είναι ποικιλόμορφη και πλέον γίνεται μεγάλος λόγος για το μικροπεριβάλλον του καρκίνου (Tumor Micro Environment, TME), καθώς αποτελεί σημείο κατανόησης για την βιολογία του καρκίνου με αποτέλεσμα να μπορεί να οδηγήσει σε βελτίωση και εξέλιξη της μοριακής διάγνωσης και θεραπείας.² Με βάση αυτό, λοιπόν, επικεντρωθήκαμε και στο φαινόμενο της ενισχυμένης διαπερατότητας και κατακράτησης (Enhanced permeability and retention effect, EPR), το οποίο οδήγησε κίολας στην ανάπτυξη του κλάδου της Φαρμακευτικής Νανοτεχνολογίας. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα που προσφέρει αυτός ο κλάδος είναι ότι ιδανικά στοχεύει μόνο στα καρκινικά κύτταρα αφήνοντας τα υγιή κύτταρα ανέπαφα σε σύγκριση με τη χημειοθεραπεία που σκοτώνει υγιή και καρκινικά κύτταρα μαζί.

Έτσι πλέον, τρεις διαφορετικοί κλάδοι, η Νανοτεχνολογία, η Θεραπεία και η Διαγνωστική, ενώθηκαν και το σημείο τομής τους δίνει τον κλάδο των Θεραπογνωστικών. Είναι εμφανές λοιπόν, ότι ένα θεραπογνωστικό είναι ένα μέσο (νανο-φορέας) που μεταφέρει μία διαγνωστική και μία θεραπευτική ουσία ή αποτελείται από μία ουσία που έχει ταυτόχρονα τον διπλό ρόλο διαγνωστικού και θεραπευτικού. Αυτά συνήθως επιτυγχάνονται με την δημιουργία αυτών των ουσιών ως νανοσωματίδια.

Επιπλέον, ενδιαφέρον αποτελεί το είδος των πολυμερών που θα χρησιμοποιηθούν ως νανοσωματίδια. Μετά από τις έρευνες, τα συζυγιακά πολυμερή δείχνουν να είναι ιδανικά για τις παραπάνω εφαρμογές, διότι το εκτεταμένο π- συζυγιακό σύστημα που διαθέτουν, τους προσδίδει εξαιρετικές οπτικές και ηλεκτρικές ιδιότητες, οι οποίες χρησιμεύουν στις θεραπείες που καθοδηγούνται με εικόνα (image- guided therapy), στην κυτταρική απεικόνιση (cell imaging). Πιο συγκεκριμένα, βρίσκουν εφαρμογές στη φωτοθερμική θεραπεία και στην φωτοακουστική απεικόνιση.³

1.2.: Σκοπός της παρούσας Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας

Όσο αναπτύσσεται η επιστήμη, κρίνεται όλο και πιο αναγκαία η ανάπτυξη νέων διαγνωστικών και θεραπευτικών μέσων για ασθένειες, οι οποίες είναι καταστροφικές για την ανθρώπινη ζωή, αλλά και για την χρόνια σωματική ταλαιπωρία που μπορεί να προκαλούν στα αρχικά στάδια. Μία από αυτές είναι ο καρκίνος, ο οποίος έχει τη δυνατότητα να προσβάλλει πολλά διαφορετικά όργανα και ιστούς του ανθρώπινου σώματος. Η εισαγωγή ενός καινοτόμου κλάδου όπως της Νανοτεχνολογίας σε εφαρμογή πεδίων, όπως η Ιατρική και η Φαρμακευτική, αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά βήματα της επιστήμης απέναντι στον άνθρωπο.

Για το λόγο αυτό, στην παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία, σκοπό θα αποτελέσει η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός κάποιων συζυγιακών πολυμερών, τα οποία θα μετατραπούν σε υδατοδιαλυτά νανοσωματίδια για περαιτέρω μελέτη των χαρακτηριστικών τους και στην συνέχεια θα μελετηθούν *in vitro* σε εφαρμογές βιοαπεικόνισης ως ιχνηθέτες φθορισμού. Τα 3 συζυγιακά πολυμερή που συντέθηκαν έχουν δομή Δότη-Δέκτη (Donor-Acceptor, D-A) και αποτελούνται από θειένυλο-υποκατεστημένου βενζοδιθειοφαινίου, φαίνυλο- και θειένυλο-υποκατεστημένα ιντακενοδιθειοφαινία ως μονάδες δότη και ως μονάδα δέκτη θα είναι και στις 3 περιπτώσεις η διθειένο-πυρρολοδιόνη (παράγωγο της με αλειφατική ομάδα συνδεδεμένη στο άτομο N). Συμβολίζονται με BTTPD-Th (CP1), IDTDTPD-Ph (CP2) και IDTDTPD-Th (CP3) αντίστοιχα με τη σειρά της μονάδας δότη που αναφέρθηκε. Τα συζυγιακά αυτά πολυμερή χαρακτηρίστηκαν με $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, GPC, φασματοσκοπία UV-Vis και φθορισμού. Επίσης, έγινε μία θεωρητική προσέγγιση και μελέτη των διμερών αυτών των πολυμερών στο πρόγραμμα Gaussian 09W. Στη συνέχεια, κατασκευάστηκαν τα νανοσωματίδια αυτών με την μέθοδο της νανοκαταβύθισης και του εγκλωβισμού και χαρακτηρίστηκαν με DLS, δυναμικό zeta, φασματοσκοπία UV-Vis και φθορισμού και μικροσκοπία AFM (στην περίπτωση των νανοσωματιδίων με νανοκαταβύθιση). Τέλος, τα νανοσωματίδια που κατασκευάστηκαν σε νερό μέσω νανοκαταβύθισης μελετήθηκαν *in vitro* κυρίως σε καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου HCT-116, αλλά και σε υγιή ενδοθηλιακά κύτταρα απομονωμένα από ομφάλιους λώρους HUVECs.

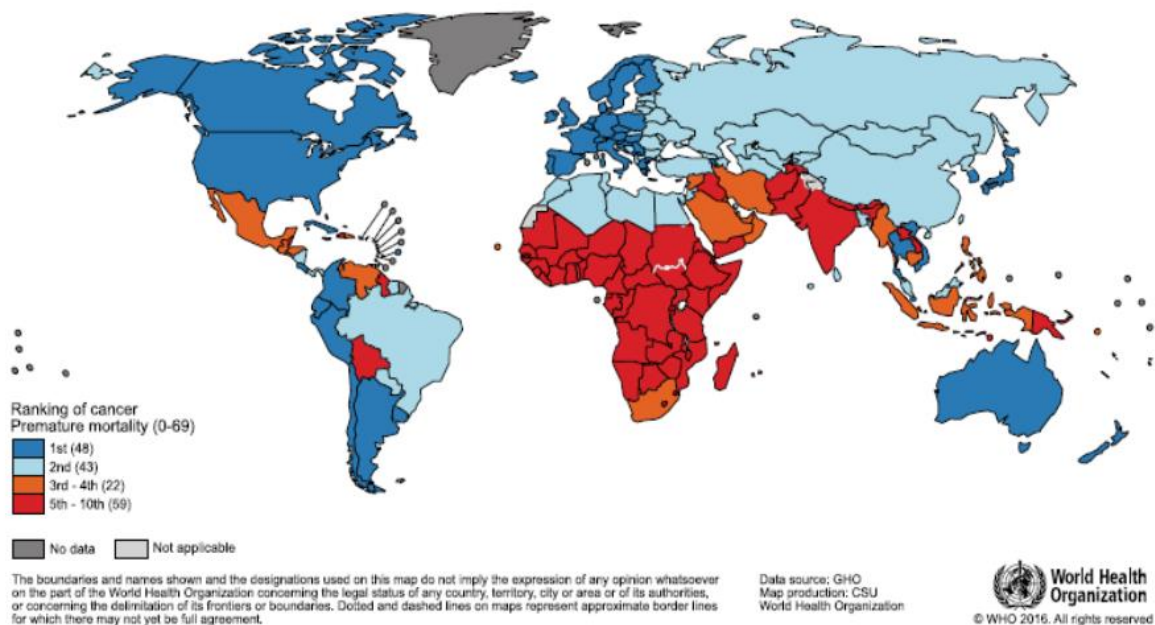
Η έρευνα της μεταπτυχιακής διπλωματικής αυτής εργασίας εκπονήθηκε στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, στο Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (Αθήνα), στο Ινστιτούτο Βιαϊατρικών Ερευνών του Ινστιτούτου Τεχνολογιών και Επικοινωνίας (IMBB-FORTH, Ιωάννινα) και στο Τμήμα Μηχανικών Επιστήμης των Υλικών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Κεφάλαιο 2:

2.1: Καρκίνος και Στατιστικά

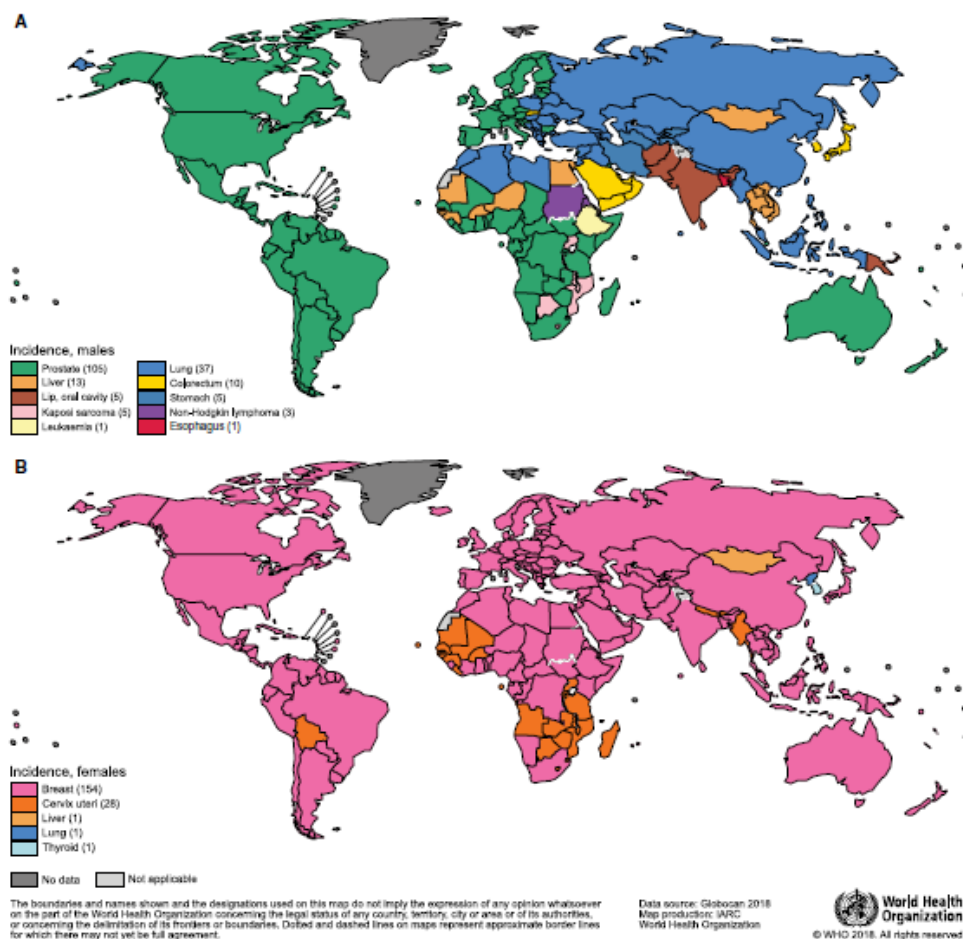
Οι μη μεταδοτικές ασθένειες (Noncommunicable diseases, NCDs), όπως οι καρδιοαγγειακές παθήσεις και ο καρκίνος, αποτελούν την κύρια, πλέον, αιτία θανάτου σε παγκόσμια κλίμακα. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO), ο καρκίνος υπολογίζεται ότι είναι η δεύτερη αιτία θανάτου παγκοσμίως. Υπολογίζεται ότι απεβίωσαν λόγω καρκίνου περίπου 9,6 εκατομμύρια άνθρωποι μόνο το έτος του 2018 και ότι θα υπάρξουν νέες περιπτώσεις με καρκίνο, οι οποίες αγγίζουν των αριθμό των 18,1 εκατομμυρίων ανθρώπων.⁴

CA CANCER J CLIN 2018;68:394-424



Εικόνα 1: Παγκόσμιος Χάρτης όπου παρουσιάζονται οι εθνικές μετρήσεις του καρκίνου ως αιτία θανάτου κάτω των 70 ετών (2015)⁴

Με διάφορες μελέτες που έχουν γίνει και με βάση τα στατιστικά στοιχεία που εξάγονται από αυτές, φαίνεται πως και στα δύο φύλα, άντρες και γυναίκες, σε ο καρκίνος του πνεύμονα είναι ο συχνότερα διαγνωσμένος καρκίνος (11,6% των συνολικών κρουσμάτων) και η κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο (18,4% από το σύνολο των θανάτων λόγω καρκίνου). Ακολουθεί ο καρκίνος του μαστού για τις γυναίκες (11,6%) και ο καρκίνος του προστάτη για τους άντρες (7,1%) ως κρούσματα και τον καρκίνο του παχέος εντέρου (9,2%), ο καρκίνος του στομάχου (8,2%) και ο καρκίνος του ήπατος (8,2%) για τη θνησιμότητα των κρουσμάτων αυτών.

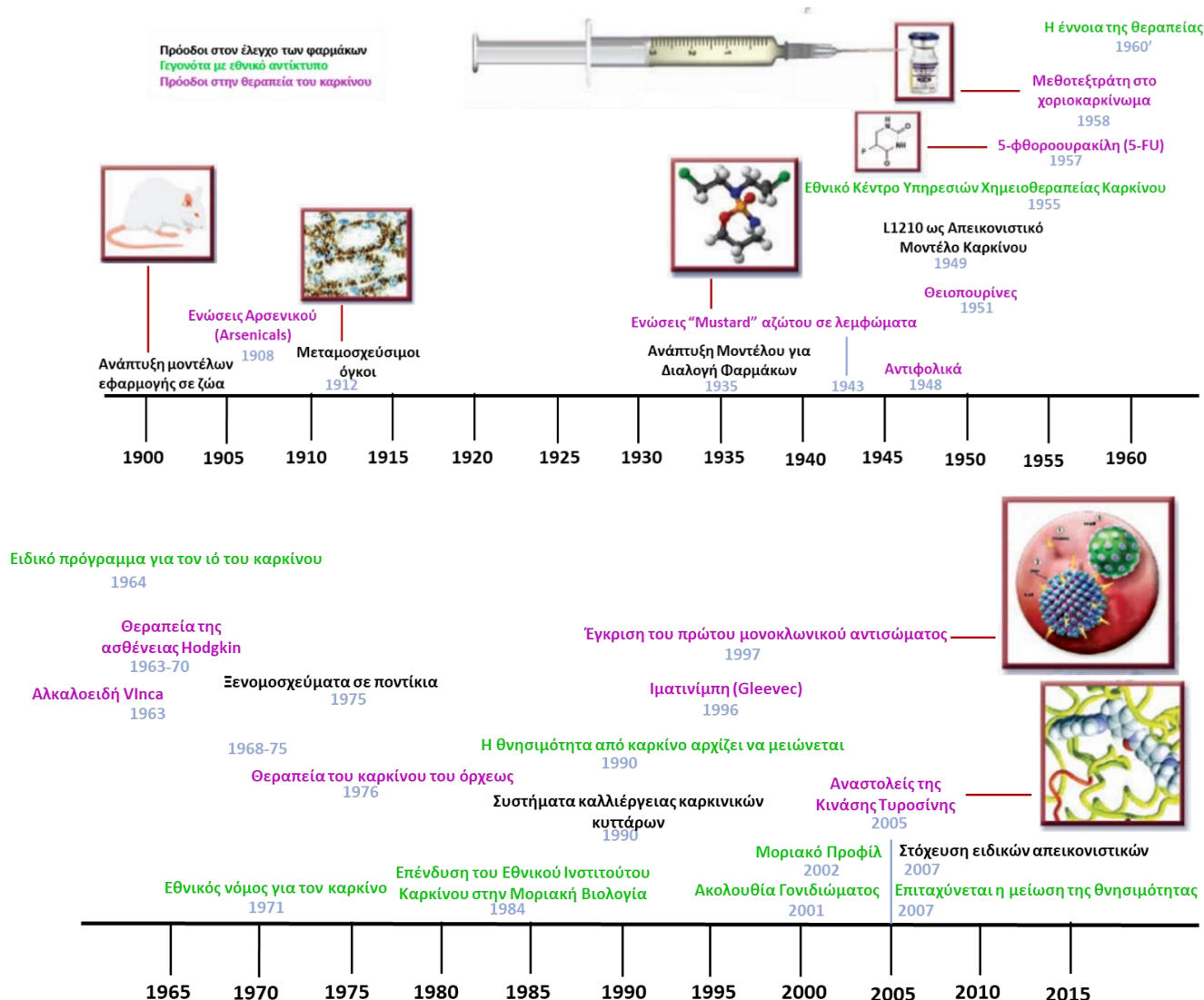


Εικόνα 2: Παγκόσμιος Χάρτης όπου παρουσιάζονται οι πιο συχνά εμφανιζόμενοι τύποι καρκίνου κάθε χώρας σε (Α) Άντρες και (Β) Γυναίκες, WHO 2018 ⁴

Μελετώντας τα στατιστικά αυτά στοιχεία, φαίνεται ακόμα περισσότερο πόσο κρίσιμη γίνεται η ανάγκη για εύρεση αποτελεσματικής θεραπείας με τις λιγότερο δυνατές παρενέργειες.

2.2: Φαρμακευτικές αγωγές και θεραπείες καρκίνου μέχρι σήμερα

Αρχικά, η χημειοθεραπεία είναι από τις πρώτες θεραπείες που χρησιμοποιήθηκαν ενάντια του καρκίνου κατά τον 20^ο αιώνα και συνεχίζει να εφαρμόζεται μέχρι και σήμερα. Είναι από τις πιο διαδεδομένες θεραπείες με εφαρμογή σε χιλιάδες ασθενείς. Ο όρος «χημειοθεραπεία» χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Γερμανό χημικό Paul Ehrlich στις αρχές της δεκαετίας 1900. ⁵ Έτσι έγινε η αρχή για τη βελτίωση της χημειοθεραπείας με την πάροδο των επόμενων χρόνων και κατά τη διάρκεια του 2^{ου} Παγκοσμίου Πολέμου. Συνοπτικά, η πρόοδος αυτή παρατίθεται στις παρακάτω εικόνες (Εικόνες 3,4).



Εικόνες 3,4: Συνοπτική Ιστορική Απεικόνιση Χημειοθεραπείας

Η χημειοθεραπεία, λοιπόν, είναι μια μέθοδος θεραπείας που χρησιμοποιεί χημικές ουσίες, οι οποίες ονομάζονται χημειοθεραπευτικά. Δηλαδή χορηγούνται στον ασθενή κυτταροτοξικά φάρμακα για την καταπολέμηση ενός είδους καρκίνου, τα οποία λόγω του ότι προκαλούν βλάβες στα κύτταρα με σκοπό να σταματήσουν την αναπαραγωγή τους, επηρεάζει τόσο τα υγιή όσο και τα καρκινικά κύτταρα. Αυτό αποτελεί ένα μειονέκτημα της θεραπείας αυτής, διότι δεν είναι στοχευμένη μόνο στα καρκινικά κύτταρα, αλλά και στα υγιή. Επιπλέον, λόγω του ότι καταστρέφονται και τα υγιή κύτταρα, η χημειοθεραπεία εμφανίζει συνήθως στους ασθενείς παρενέργειες, όπως η έντονη τριχόπτωση, η μη ανάπτυξη νέων τριχοθυλάκιων, η ναυτία, ο εμετός, η διάρροια, η κόπωση κ.α. Γι' αυτό είναι σημαντικό η επιστήμη να επικεντρωθεί στην εύρεση θεραπειών με στόχο μόνο την καταστροφή καρκινικών κυττάρων.

Κατά την ανάπτυξη της χημειοθεραπείας για την αντιμετώπιση όγκων, άρχισαν να χρησιμοποιούνται και οι χειρουργικές επεμβάσεις (1950). Βέβαια μία χειρουργική επέμβαση για την αφαίρεση όγκου έχει κάποιες προϋποθέσεις για να θεωρηθεί κατάλληλη θεραπεία, όπως να είναι τοπικό, δηλαδή να εντοπίζεται μόνο σε ένα

μέρος του οργανισμού. Πολλές φορές δεν είναι δυνατόν να αφαιρεθεί όλος ο όγκος και έτσι η χειρουργική επέμβαση γίνεται για αφαίρεση του μεγαλύτερου δυνατού μέρους του όγκου και συνδυάζεται με τη χημειοθεραπεία ή την ακτινοθεραπεία για να γίνει πιο αποτελεσματική. Επιπρόσθετα, αν υπάρχει μετάσταση και ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί σε μεγάλο βαθμό, η χειρουργική επέμβαση δεν μπορεί να θεραπεύσει τον ασθενή.

Στο πλαίσιο των θεραπειών για τον καρκίνο πρέπει να αναφερθεί και η ακτινοθεραπεία. Η ακτινοθεραπεία άρχισε να αναπτύσσεται βαθμιαία από το 1896, νωρίτερα κιόλας από τη χημειοθεραπεία, και ο πρώτος ακτινοθεραπευτής ήταν ο Emil Grubbe, ο οποίος μετά από έκθεσή του σε ακτίνες X διαπίστωσε την απολέπιση των χεριών του και έτσι, έπεισε έναν από τους καθηγητές του να του επιτρέψει να ακτινοβολήσει μια ασθενή με καρκίνο, την Rose Lee, που έπασχε από τοπικά προχωρημένο καρκίνο του μαστού. Σημαντική συνεισφορά στην ακτινοθεραπεία είχαν φυσικά και η Marie Curie με τον άντρα της, Pierre Curie, όπου εισήγαγαν τη χρήση ραδίου στην ακτινοθεραπεία σε συγκεκριμένες δόσεις για να είναι αποτελεσματική αλλά ταυτόχρονα να μην είναι επιβλαβής για τον οργανισμό.⁶ Επομένως, η ακτινοθεραπεία εξελίχθηκε και συνδύασε και τη ραδιοθεραπεία. Αργότερα, εισήχθησαν στην κλινική πράξη καινούρια τεχνητά ραδιονουκλίδια, όπως το ¹³¹I, ¹⁹²Ir, ¹²⁵I, ¹³⁷Cs, παραγκωνίζοντας το ράδιο. Τέλος, από την δεκαετία του 70 έως σήμερα χρησιμοποιούνται ως ραδιοθεραπευτικά μηχανήματα οι γραμμικοί επιταχυντές, οι οποίοι επιταχύνουν φωτόνια ακτίνων X και ηλεκτρόνια. Πλέον, εφαρμόζεται σε πάνω από 50% ασθενείς που πάσχουν από καρκίνο. Ωστόσο, η ακτινοθεραπεία καταστρέφει όχι μόνο τα καρκινικά κύτταρα, αλλά και τα υγιή, όπως και η χημειοθεραπεία.⁷ Κατά συνέπεια, έχει παρόμοιες παρενέργειες με τη χημειοθεραπεία.

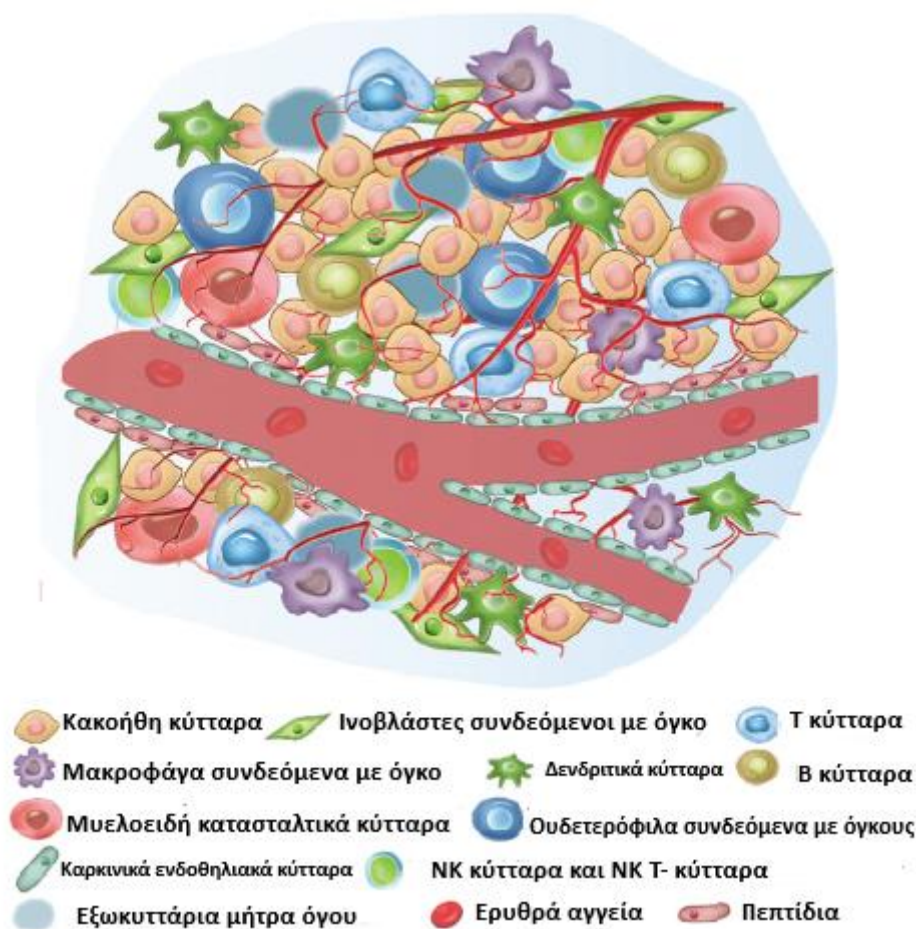
Καθώς η επιστήμη εξελίσσεται, βρέθηκαν και άλλοι μέθοδοι θεραπείας του καρκίνου, όπως η ορμονοθεραπεία και η ανοσοθεραπεία. Είναι πιο στοχευμένες θεραπείες, καθώς επηρεάζουν τις ορμόνες και το ανοσοποιητικό σύστημα αντίστοιχα. Η ορμονοθεραπεία είναι μια αντικαρκινική θεραπεία που αναστέλλει την έκκριση ορμονών ή εμποδίζει τη δράση τους, δυσχεραίνοντας έτσι την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων, ενώ η ανοσοθεραπεία είναι η χρήση του ανοσοποιητικού συστήματος για την επίθεση και την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων.

Παρ' όλα αυτά, λόγω της αυξημένης ανάγκης για περισσότερο βελτιωμένες θεραπείες και με μικρότερο κόστος, η επιστήμη καλείται να αναπτύξει και να δημιουργήσει κάποιες νέες θεραπείες κατά του καρκίνου, διαφορετικές από τις ήδη υπάρχουσες για την πιθανή εξάλειψη των δυσάρεστων προαναφερθέντων παρενεργειών των θεραπειών αυτών και επιτυγχάνοντας ταυτόχρονα και μεγαλύτερα ποσοστά επιτυχίας.

2.3: Μικροπεριβάλλον του Καρκίνου (Tumor Microenvironment, TME)

Το μικροπεριβάλλον του καρκίνου είναι αυτό που περιβάλλει έναν όγκο και περιλαμβάνει τα περιβάλλοντα αιμοφόρα αγγεία, ανοσοκύτταρα, ινοβλάστες, μόρια σηματοδότησης και εξωκυττάρια μήτρα. Όλα τα κύτταρα είναι ενσωματωμένα στην εξωκυττάρια μήτρα, που αποτελείται από κολλαγόνο και πρωτεογλυκάνες, η οποία παρέχει μια ενυδατωμένη μήτρα για να υποστηρίξει την ανάπτυξη του όγκου. Η εμφάνιση όγκου συνεπάγεται αυτόματα την εμφάνιση TME, το οποίο με τη σειρά του

επηρεάζεται με τις αλληλεπιδράσεις των καρκινικών παραγόντων. Για παράδειγμα, οι όγκοι μπορούν να επηρεάσουν το μικροπεριβάλλον απελευθερώνοντας εξωκυτταρικά σήματα.⁸



Εικόνα 5: Απεικόνιση ενός μικροπεριβάλλοντος καρκίνου (TME)⁸

Το TME παρουσιάζει κάποια χαρακτηριστικά, τα οποία βοηθούν στην καλύτερη κατανόηση της λειτουργίας του καρκινώματος. Τα χαρακτηριστικά αυτά δίνουν στην επιστημονική κοινότητα μία βοήθεια όσον αφορά τον σχεδιασμό φαρμάκων και θεραπειών για τον καρκίνο. Κάποια απ' αυτά είναι τα εξής:

- Το όξινο pH που εμφανίζουν τα καρκινικά κύτταρα, το οποίο πιθανολογείται πως οφείλεται στο γαλακτικό οξύ που παράγεται από την κατανάλωση γλυκόζης. Η κατανάλωση γλυκόζης αυξάνεται πολύ στα καρκινικά κύτταρα λόγω της μεγάλης ανάγκης τους για να αναπτυχθούν.⁹
- Ο γρήγορος πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων σχετίζεται με υψηλή ανάγκη οξυγόνου, η οποία δεν μπορεί να διατηρηθεί από την περιβάλλουσα παροχή αίματος, με αποτέλεσμα περιορισμένης διαθεσιμότητας οξυγόνου στα κύτταρα και υποξία.¹⁰
- Τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, τα οποία προστατεύουν τα φυσιολογικά κύτταρα από υψηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου που μπορεί να είναι τοξικές για το κύτταρο. Στα καρκινικά κύτταρα, αυτά τα ένζυμα δε λειτουργούν φυσιολογικά και κατά συνέπεια δεν καταστρέφονται, αλλά παραμένουν πολλές ρίζες οξυγόνου, οι οποίες είναι τοξικές για τον ανθρώπινο οργανισμό.

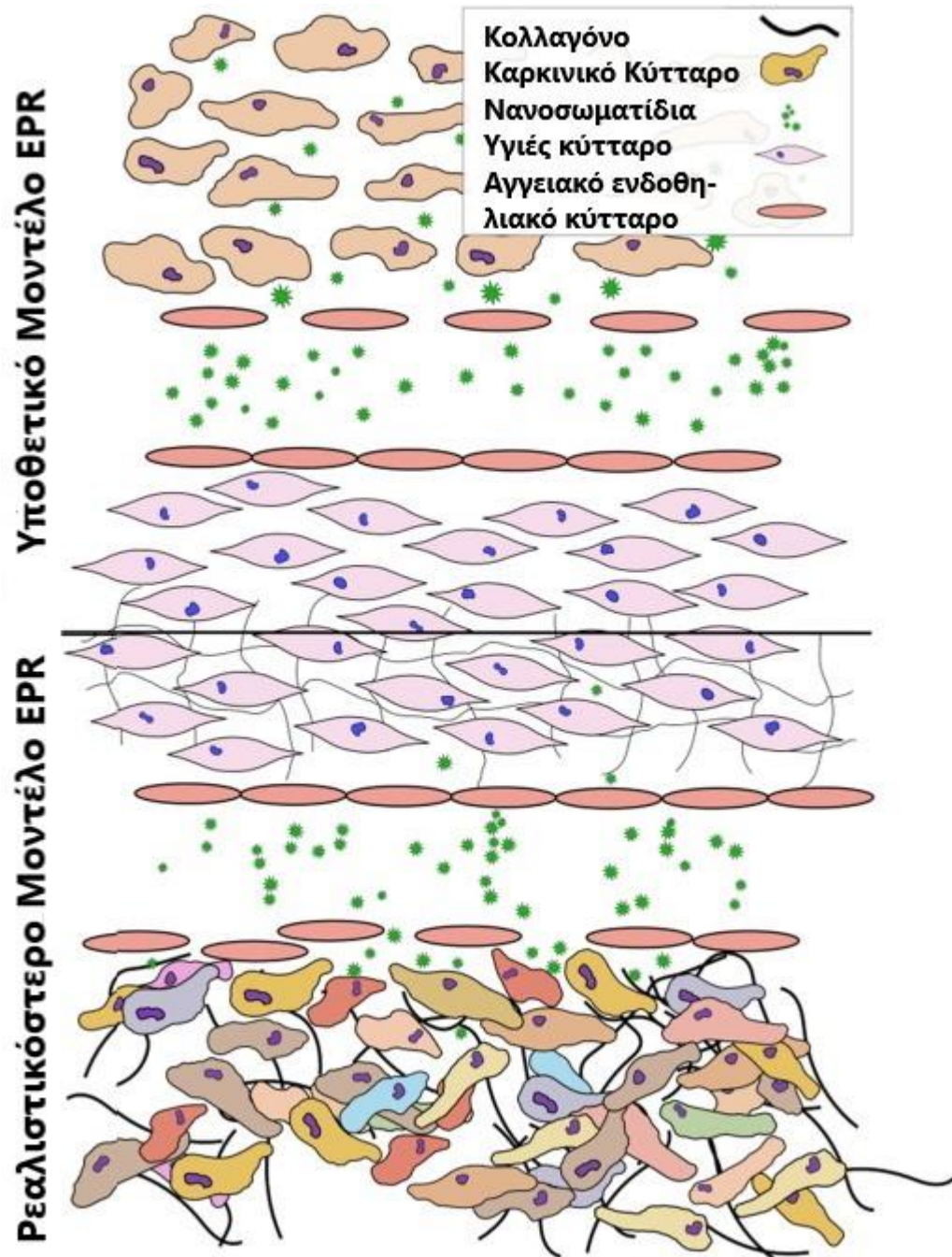
- Το ενισχυμένο φαινόμενο διαπερατότητας και κατακράτησης (EPR) είναι η παρατήρηση ότι το αγγειακό σύστημα των όγκων έχει συχνά διαρροή και συσσωρεύει μόρια στην κυκλοφορία του αίματος σε μεγαλύτερο βαθμό από ό, τι στον κανονικό ιστό.¹¹
- Στα καρκινικά κύτταρα υπάρχει και η *υπερέκφραση πρωτεϊνών* σε κάποιες περιπτώσεις όπου η αναστολή τους δεν πραγματοποιείται πλέον όπως θα γινόταν στην περίπτωση υγιών κυττάρων.

2.4: Φαινόμενο Ενισχυμένης Διαπερατότητας και Κατακράτησης (Enhanced Permeability and Retention Effect, EPR effect)¹¹⁻¹⁴

Το φαινόμενο ενισχυμένης διαπερατότητας και κατακράτησης είναι υπεύθυνο για την εξέλιξη του πεδίου των Νανοσωματιδίων ως διαγνωστικά ή/και θεραπευτικά μέσα στον καρκίνο. Το φαινόμενο αυτό βασίζεται στην ιδιαιτερότητα των καρκινικών όγκων να μπορεί να κατακρατεί συστατικά, όπως μακρομόρια, νανοσωματίδια, λιπιδικά νανοσωματίδια, εντός του όγκου. Αυτό συμβαίνει διότι στους καρκινικούς όγκους δημιουργείται υπερ-αγγείωση λόγω της αυξημένης αυτής ανάγκης που έχουν τα καρκινικά κύτταρα για οξυγόνο και θρεπτικά υλικά, με αποτέλεσμα να υπάρχουν δομικές ατέλειες στην υπερ-αγγείωση και κατά συνέπεια να δημιουργούνται οπές στα ενδοθηλιακά κύτταρα των κυτταρικών τοιχωμάτων. Επομένως, οι οπές αυτές είναι που κατακρατούν και αφήνουν τα νανοσωματίδια να διαπεράσουν τον καρκινικό ιστό σε αντίθεση με τον υγιή ιστό.

Συνεπώς, ο κλάδος των νανοφαρμάκων θεωρείται ιδανικός για θεραπεία ή/και διάγνωση του καρκίνου, εφόσον λόγω του φαινομένου EPR στοχεύονται μόνο τα καρκινικά κύτταρα και όχι τα υγιή. Δηλαδή παρέχεται πλέον το πλεονέκτημα που έλειπε από τις ήδη υπάρχουσες θεραπείες κατά του καρκίνου και κρίνεται η ανάγκη να μελετηθεί περισσότερο ο κλάδος της Ιατρικής Νανοτεχνολογίας ή Νανοϊατρικής.

Τέλος, σημαντική προϋπόθεση για την ικανοποιητική συγκέντρωση των νανοφορέων στο καρκίνο-στόχο μέσω του EPR είναι η παρατεταμένη κυκλοφορία τους στο αίμα (stealth system), ώστε σταδιακά να επιτευχθεί αυξημένη εντόπισή τους μέσω της διάχυσης από τα υψηλής διαπερατότητας αιμοφόρα αγγεία του όγκου.

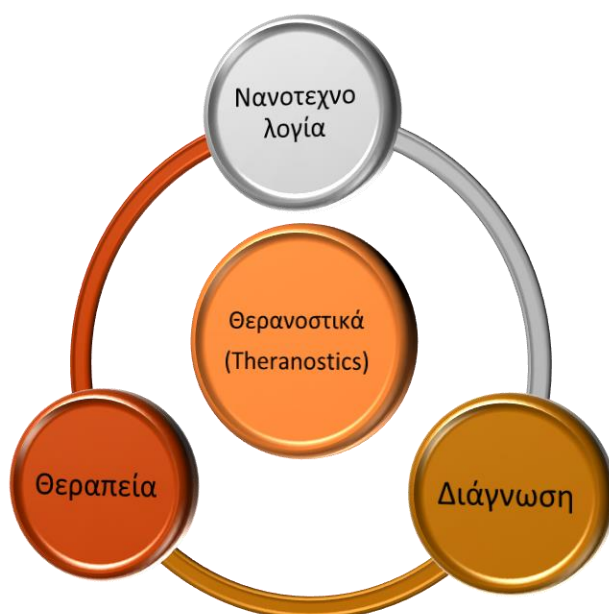


Εικόνα 6: Συμβατική και ρεαλιστικότερη απεικόνιση αντίστοιχα του φαινομένου EPR ¹¹

2.5.1: Θεραπευτικά ή Θεραπογνωστικά (Theranostics)

Τα θεραπεπογνωστικά ή θεραπευτικά (theranostics), όπως είναι ευρέως γνωστά ως ελεύθερη μετάφραση, αποτελούν κατηγορία φαρμάκων που περιέχουν ένα μέσο το οποίο φέρει μία διαγνωστική ή/και θεραπευτική ουσία. Συνήθως συνδυάζει και τις δύο ουσίες, δηλαδή μπορεί να λειτουργήσει ως διαγνωστικό, αλλά και ως θεραπευτικό μέσο ταυτόχρονα.

Το πεδίο των θεραπευτικών είναι ένα σχετικά καινούριο πεδίο και χρησιμοποιεί και το πεδίο της Νανοτεχνολογίας, της Θεραπείας και της Διάγνωσης για να εκμεταλλευτεί το πλεονέκτημα την ικανότητα ενός μοναδικού νανοσωματιδίου να μπορεί να φέρει δύο ή παραπάνω ουσίες. Επιπρόσθετα, τα θεραπευτικά επιτρέπουν και τη καθοδηγούμενη θεραπεία μέσω συστημάτων παρακολούθησης, όπως η φωτοδυναμική ή η φωτοθερμική θεραπεία. Επίσης, τα θεραπευτικά επιτρέπουν, για παράδειγμα, την ανίχνευση ενός συγκεκριμένου βιοδείκτη που ενεργοποιεί την απελευθέρωση ενός φαρμάκου, ενώ παράλληλα παρέχει τα μέσα για την παρακολούθηση της νόσου σε πραγματικό χρόνο, λόγω μοναδικών οπτικών ιδιοτήτων (π.χ. στην βιοαπεικόνιση μέσω φθορισμού).¹⁵



Εικόνα 7: Κλάδοι που απαρτίζουν την έννοια των Θεραπευτικών

2.5.2: Νανοτεχνολογία και Νανοϊατρική

Σπουδαίο ενδιαφέρον έχει αποκτήσει τα τελευταία χρόνια και ο τομέας της Νανοτεχνολογίας. Ουσιαστικά, ο τομέας αυτός ασχολείται με την επιστήμη, την μηχανική και την τεχνολογία σε νανο-κλίμακα. Δηλαδή εκμεταλλεύεται το γεγονός ότι σε αυτά τα μεγέθη έχουμε σημαντικές κβαντικές αλληλεπιδράσεις. Επιπρόσθετα, λόγω αυτής της κλίμακας του μεγέθους, βρίσκει εφαρμογή σε πολλούς τομείς όπως τα φάρμακα, η ιατρική, το περιβάλλον, η πληροφορική, τα υλικά κ.α. Επιπλέον, το μικρό μέγεθος της κλίμακας τους μπορεί να προσομοιάσει τα βιομόρια, μιας και τα μεγέθη είναι παρόμοια. Έτσι, η Νανοτεχνολογία φαίνεται να είναι ιδιαίτερως χρήσιμη για in vitro, αλλά και in vivo έρευνα και εφαρμογές.

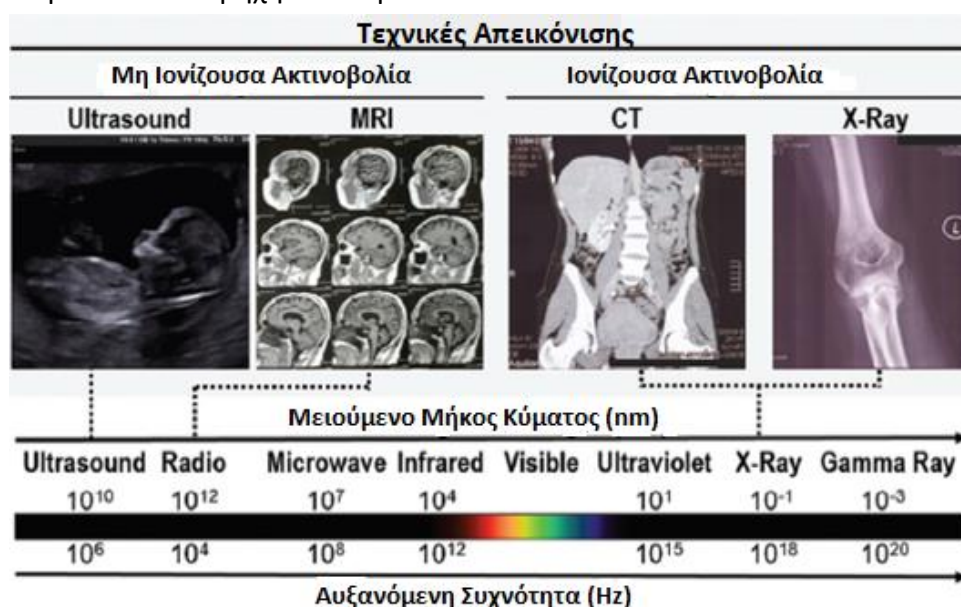
Η ενσωμάτωση, λοιπόν, της Νανοτεχνολογίας στον τομέα της Βιοχημείας- Ιατρικής έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη διαγνωστικών συσκευών, αναλυτικών εργαλείων, συσκευών φυσικοθεραπείας και μέσα διανομής φαρμάκων. Τα νανοσωματίδια αυξάνουν τη χημική δραστηριότητα τους λόγω της κρυσταλλογραφικής επιφανειακής δομής τους μαζί με τη μεγάλη τους επιφάνεια σε αναλογία όγκου.^{16,17}

Αναλυτικότερα, η Νανοϊατρική και τα νέα μοντέλα για τη θεραπεία του καρκίνου συμβαδίζουν και εξελίσσονται με την ανάπτυξη νέων στοχευμένων στρατηγικών για την αποτελεσματική παροχή θεραπευτικών και συνδυασμένων θεραπειών. Ταυτόχρονα, υπάρχει και η περίπτωση ενός μεμονωμένου πολύ-λειτουργικού νανοφορέα (nanocarrier), όπου μπορεί να στοχεύει περισσότερους από έναν τύπους καρκινικών κυττάρων. Πράγματι, η προσαρμογή της Νανοϊατρικής σύμφωνα με τις νέες εξελίξεις και η περαιτέρω κατανόηση της φυσιολογίας του καρκίνου και του ΤΜΕ (συμπεριλαμβανομένων των αγγειακών ανωμαλιών, της οξυγόνωσης, της αιμάτωσης, του pH και των μεταβολικών καταστάσεων), οδηγεί προς την κατασκευή σχεδόν άπειρων διαμορφώσεων νανοδομημάτων. Επιπλέον, ο έλεγχος της φαρμακοκινητικής και η δυναμική των διαφορετικών φαρμάκων που μελετιούνται σε συνδυασμό με νανοφορείς πιθανόν να οδηγήσουν σε καλύτερα αποτελέσματα σχετικά με την επίδραση τους, καθώς η συγχρόνηση φαρμάκων μπορεί να μειώσει σημαντικά την πιθανότητα εμφάνισης αντοχής σε πολλαπλά φάρμακα. Εκτός αυτού, η Νανοϊατρική μπορεί επίσης να διευκολύνει τις συμβατικές προσεγγίσεις καθοδηγώντας τη χειρουργική αφαίρεση όγκων, καθώς και ενισχύοντας την ακτινοθεραπεία. Η Νανοϊατρική μπορεί να επιτύχει την μείωση ή καταστροφή ενός συμπαγή όγκου μέσω παθητικής ή/και ενεργού στόχευσης, οι οποίες συνδέονται καθώς η ενεργή διαδικασία στόχευσης εμφανίζεται μετά από παθητική συσσώρευση εντός των όγκων. Αυτή η συσσώρευση οφείλεται στο φαινόμενο αυξημένης διαπερατότητας και κατακράτησης (EPR) που συμβαίνει αφού το αγγειακό σύστημα του όγκου τείνει να έχει διαρροή και η κάθαρση από το λεμφικό σύστημα τείνει να είναι κακή. Στην πραγματικότητα, τα τελευταία χρόνια, οι ερευνητές έχουν επικεντρωθεί στην αντιμετώπιση των παραγόντων που χαρακτηρίζουν το ΤΜΕ χρησιμοποιώντας τη νανοτεχνολογία.¹⁰

Συνοπτικά, το μέγεθος των νανοσωματιδίων παίζει κρίσιμο ρόλο στις ιδιότητες που αυτά εμφανίζουν και συνήθως διαφέρουν αρκετά με τις ιδιότητες των αντίστοιχων ενώσεων που βρίσκονται σε μεγαλύτερα μεγέθη. Ορισμένες μοναδικές ιδιότητες των νανοϋλικών περιλαμβάνουν υψηλότερη θερμική σταθερότητα, ευκαμψία, κ.α. Αυτές οι ιδιότητες διευκολύνουν τις εμπορικές, τεχνολογικές και θεραπευτικές εφαρμογές των τεχνητών νανοϋλικών. Άλλα μοναδικά χαρακτηριστικά των νανοϋλικών περιλαμβάνουν βελτιωμένες ηλεκτρομαγνητικές, καταλυτικές και φαρμακοκινητικές ιδιότητες. Αυτές οι ιδιότητες είναι σημαντικές όταν τα νανοϋλικά χρησιμοποιούνται στην ιατρική και τη φαρμακοβιομηχανία.¹⁸

2.6.:Βιοαπεικόνιση και Θεραπεία^{19,20}

Η βιοϊατρική απεικόνιση περιλαμβάνει ένα ευρύ φάσμα μη επεμβατικών μορφών απεικόνισης που παράγουν ανατομικές και φυσιολογικές πληροφορίες. Οι διάφορες τεχνικές που αναπτύσσονται για την απόκτηση εικόνων κάνουν χρήση των περισσότερων τύπων ακτινοβολίας του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος (Εικόνα 8). Η ακτινοβολία αποτελείται από φωτόνια τα οποία παρουσιάζουν σωματιδιακή και κυματοειδή συμπεριφορά και μπορούν να μεταφέρουν διαφορετικές ποσότητες ενέργειας. Η ενέργεια είναι ανάλογη της συχνότητάς της και αντιστρόφως ανάλογη με το μήκος κύματος της. Κάτω από 200nm, ένα φωτόνιο έχει αρκετή ενέργεια για να προκαλέσει ιονισμό, μια διαδικασία στην οποία αφαιρείται ένα ηλεκτρόνιο δεσμευμένο σε ένα άτομο. Αυτή η διαδικασία προκαλείται από απορρόφηση ύλης της ακτινοβολίας σε υψηλή συχνότητα και πολύ μικρά μήκη κύματος, όπως οι ακτίνες γ, οι ακτίνες Χ και η υπεριώδης ακτινοβολία. Πάνω από την περιοχή UV, η μη ιονίζουσα ορατή περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος αποτελείται από μήκη κύματος με εύρος 400-800nm, που ακολουθείται από τις φασματικές περιοχές της φθίνουσας ενέργειας, όπου ταξινομούνται ως υπέρυθρες, μικροκύματα, ραδιοκύματα και υπερηχητικά κύματα.



Εικόνα 8: Αναπαράσταση του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος (κάτω) και των κοινών τεχνικών κλινικής απεικόνισης που χρησιμοποιούν ιονίζουσα και μη ιονίζουσα ακτινοβολία (πάνω). Υπολογιστική τομογραφία (CT) και απεικόνιση μαγνητικού συντονισμού (MRI).¹⁹

Η μικροσκοπία ορατού φωτός είναι μια καθιερωμένη τεχνική οπτικής απεικόνισης που χρησιμοποιείται ευρέως για την έρευνα και την κλινική διάγνωση. Τα πολύχρωμα υλικά και οι φθορίζουσες χρωστικές έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για την ενίσχυση των μικροσκοπικών δομών, επιτρέποντας την απεικόνιση της αρχιτεκτονικής ιστών και σχετικών βιολογικών διεργασιών. Οι φθορίζουσες βιολογικές ουσίες έχουν χρησιμοποιηθεί στην ανοσοϊστοχημεία για την ανίχνευση συγκεκριμένων μακρομορίων σε ιστούς και κύτταρα, κυτταρικούς υποδοχείς που εμπλέκονται στον καρκίνο, κ.α. Συνολικά, η μη ιονίζουσα ορατή φασματική περιοχή χρησιμοποιείται για την απεικόνιση μέσω φθορισμού σε μικροσκοπικό επίπεδο και η χρήση

συγκεκριμένων μηκών κύματος καθιστά δυνατή την εκτίμηση διαφορετικών παραμέτρων σε ζωντανά κύτταρα, ex vivo ή σε σταθερούς ιστούς.

Υπάρχουν μέχρι και σήμερα διάφορες μορφές βιοαπεικόνισης, όπως απεικόνιση μέσω φθορισμού που είναι το κύριο θέμα της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας, φωτοακουστική απεικόνιση, απεικόνιση μέσω Raman, αλλά και κάποιες θεραπείες που μπορούν να συνδυαστούν με τις παραπάνω μορφές βιοαπεικόνισης, όπως φωτοδυναμική και φωτοθερμική θεραπεία.

Κεφάλαιο 3:

3.1.1.: Πολυμερή

Τα πολυμερή έχουν αρχίσει να μελετώνται από τον 19^ο αιώνα και αποτελούνται από επαναλαμβανόμενα μακρομόρια τα οποία μοιάζουν με αλυσίδες, με βασική μονάδα, το μονομερές. Το πρώτο βραβείο Νόμπελ που δόθηκε σε αυτόν τον τομέα και πιο συγκεκριμένα, χημείας είναι το 1953 στον Χέρμαν Στάουντινγκερ (Hermann Staudinger) που απέδειξε την ύπαρξη των μακρομορίων, τα οποία ονόμασε πολυμερή. Με την πάροδο του χρόνου έως και σήμερα η Χημεία Πολυμερών έχει εξελιχθεί ραγδαία και συνεχίζεται ακόμα αυτή η εξέλιξη.

Ορόσημο στην πορεία της Χημείας Πολυμερών ήταν και η ανακάλυψη των αγώγιμων πολυμερών από τους Alan J. Heeger, Alan G. Mac Diarmid, Hidik Shirakawa, για την οποία απονεμήθηκε βραβείο Νόμπελ στη Χημεία το 2000. Το γεγονός αυτό σηματοδότησε ένα νέο μονοπάτι έρευνας στα αγώγιμα πολυμερικά υλικά και αργότερα στα ημιαγώγιμα (συζυγιακά) πολυμερικά υλικά.

Τα συζυγιακά πολυμερή βρίσκουν εφαρμογή στις διόδους εκπομπής φωτός ή αλλιώς γνωστά ως LEDs²¹, στους οπτικούς αισθητήρες και βιοαισθητήρες^{22,23}, στα φωτοβολταϊκά²⁴, στα FET²⁵ και πλέον σε βιολογικές εφαρμογές.²⁶

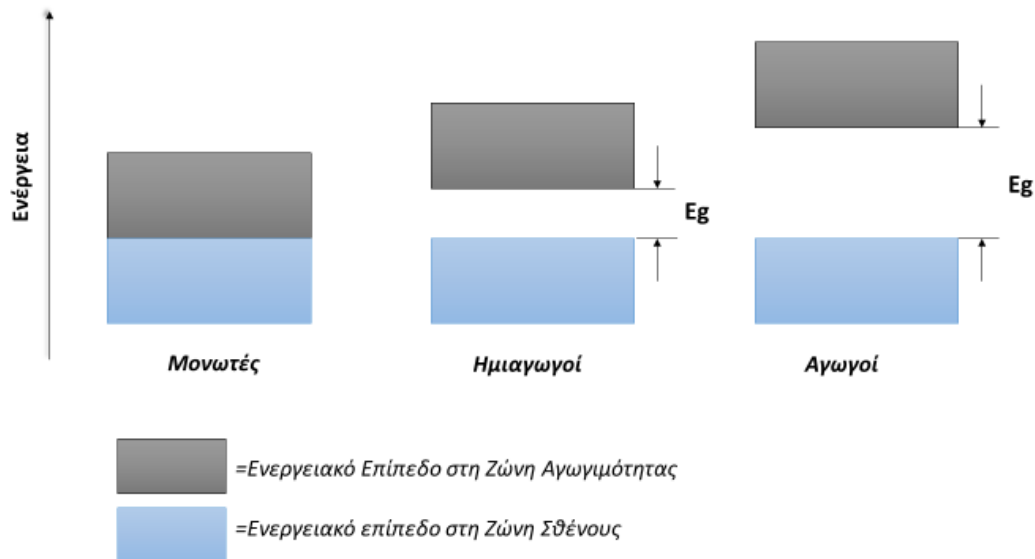
3.1.2.: Μονωτές και Αγωγοί

Όσον αφορά τις ηλεκτρικές ιδιότητες του πολυμερούς, εξετάζεται η αγωγιμότητα που αυτό διαθέτει και με βάση αυτή χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: τους μονωτές, τα ημιαγώγιμα και τα αγώγιμα πολυμερή (Εικόνα 9). Η ηλεκτρική αγωγιμότητα ορίζεται ως η ικανότητα ροής ηλεκτρονίων από ένα υλικό, δηλαδή πόσο εύκολα αυτό διαχέεται από ηλεκτρικό ρεύμα. Έτσι όσο μεγαλύτερη είναι η αγωγιμότητα ενός υλικού τόσο περισσότερο ηλεκτρικό ρεύμα θα ρέει εντός του υλικού.

Τα ηλεκτρόνια ενός μεμονωμένου ατόμου διαθέτουν διακριτά ενεργειακά επίπεδα. Όταν όμως τα άτομα πλησιάζουν μεταξύ τους για τη δημιουργία κρυσταλλικής μορφής, τα ενεργειακά επίπεδα διαφοροποιούνται ελαφρά λόγω της ατομικής αλληλεπίδρασης, με αποτέλεσμα το σχηματισμό μίας συνεχούς ενεργειακής ζώνης.²⁷ Υπάρχουν τέσσερις τύποι δομών ζώνης που είναι δυνατές σε θερμοκρασία OK. Η υψηλότερη συμπληρωμένη κατάσταση σε OK ονομάζεται ενέργεια Fermi (Fermi Energy), στην οποία θα γίνει εκτενέστερη αναφορά στο κεφάλαιο 3.1.2.1.²⁸ Οι δύο πιο σημαντικές ενεργειακές ζώνες είναι:

- 1) **Ζώνη Σθένους:** Η ζώνη σθένους είναι το ευρύ φάσμα των ενεργειών που διαθέτουν τα ηλεκτρόνια σθένους. Πρόκειται για την υψηλότερη κατειλημμένη ζώνη ενέργειας, όπου τα ηλεκτρόνια είναι παρόντα σε 0 K.
- 2) **Ζώνη Αγωγιμότητας:** Η ζώνη αγωγιμότητας είναι το ευρύ φάσμα ενεργειών που διαθέτουν τα ηλεκτρόνια αγωγιμότητας. Πρόκειται για μια μερικώς καταλαμβανόμενη ή κενή, ζώνη ενέργειας, όπου τα ηλεκτρόνια μπορούν να αυξήσουν τις ενέργειές τους, πηγαίνοντας σε υψηλότερα επίπεδα ενέργειας εντός της ζώνης, όταν εφαρμόζεται ένα ηλεκτρικό πεδίο.

Το ενεργειακό χάσμα (Energy gap ή band gap, E_g) είναι η ενεργειακή διαφορά μεταξύ της ζώνης σθένους και της ζώνης αγωγιμότητας και εκφράζει τη δυνατότητα των ηλεκτρονίων να μεταβούν από τη ζώνη σθένους στη ζώνη αγωγιμότητας.



Εικόνα 9: Απεικόνιση Ενεργειακών Επιπέδων σε Ζώνες σθένους και αγωγιμότητας σε αγωγούς, ημιαγωγούς και μονωτές

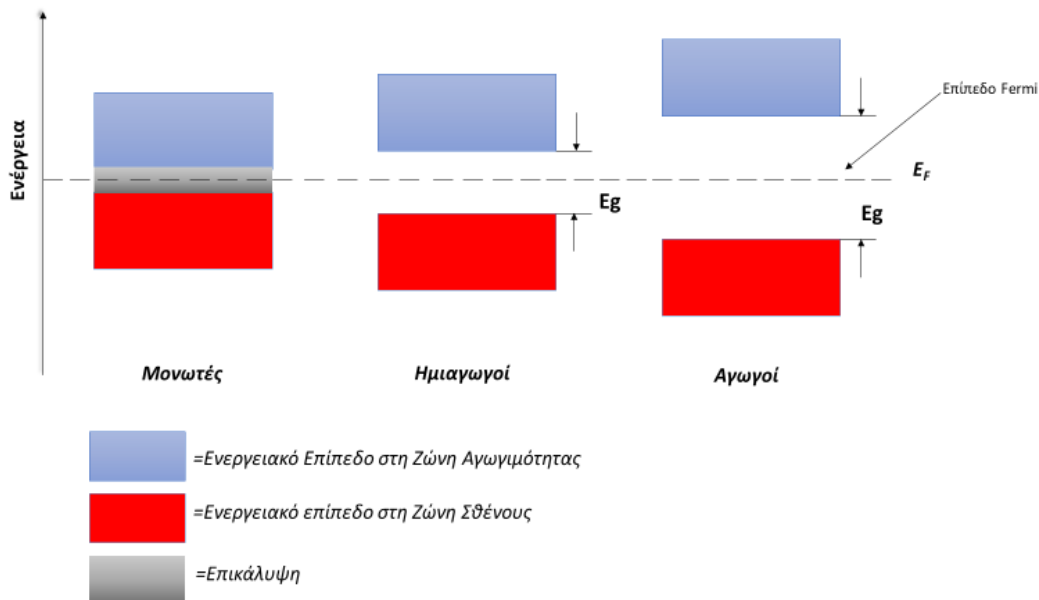
3.1.2.1.: Ενέργεια και επίπεδο Fermi ²⁹

Αρχικά, τα φερμιόνια είναι στοιχειώδη σωματίδια με την χαρακτηριστική ιδιότητα να σχηματίζουν πλήρως αντισυμμετρικές σύνθετες κβαντικές καταστάσεις. Άλλο κοινό χαρακτηριστικό τους είναι το ημιακέραιο σπιν ($1/2, 3/2, \dots$). Δεδομένου ότι τα ηλεκτρόνια είναι φερμιόνια η τοποθέτησή τους στις ενεργειακές στάθμες του κρυσταλλικού πλέγματος θα γίνει σύμφωνα με την Αρχή του Pauli, με αποτέλεσμα να ανεβαίνουμε σε όλο και ψηλότερες ενέργειες μέχρι να εξαντληθούν όλα τα διαθέσιμα ηλεκτρόνια. Η τελευταία στάθμη που καταλαμβάνεται με αυτόν τον τρόπο λέγεται ενέργεια Fermi (E_F). Ενέργεια Fermi είναι η ενέργεια της τελευταίας κατειλημμένης στάθμης του συστήματος φερμιονίων στο απόλυτο μηδέν (0K).

$$E_F = \frac{h^2}{2m} \left(\frac{3\pi^2 N}{V} \right)^{2/3} \quad (\text{E1})$$

όπου N είναι ο αριθμός των σωματιδίων, m η υπόλοιπη μάζα κάθε φερμιού, V ο όγκος του συστήματος και h η σταθερά Planck.

Σε θερμοκρασία $T=0K$ κάτω από το επίπεδο Fermi οι ενεργειακές καταστάσεις είναι κατειλημμένες, ενώ πάνω από επίπεδο Fermi οι ενεργειακές καταστάσεις είναι κενές.



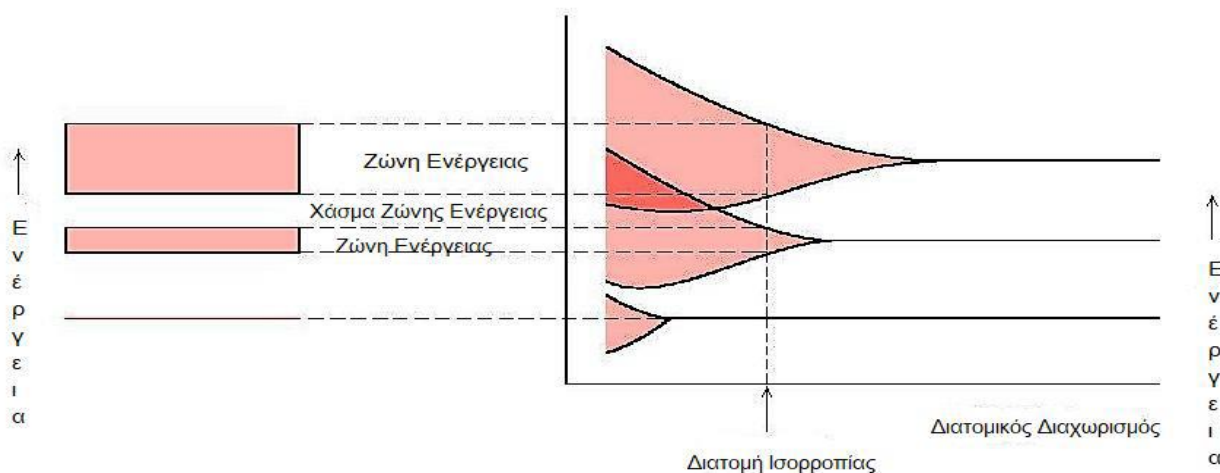
Εικόνα 10: Απεικόνιση του επιπέδου και της ενέργειας Fermi στους μονωτές, ημιαγωγούς και αγωγούς

3.1.2.2.:Θεωρία Ζωνών²⁸

Σε μεμονωμένα άτομα τα ηλεκτρόνια μπορούν να έχουν μόνο διακριτές ενέργειες. Αυτές οι επιτρεπόμενες ενέργειες προσδιορίζονται με κβαντικούς αριθμούς που αναφέρονται στη στοιβάδα των ηλεκτρονίων που καταλαμβάνει το ηλεκτρόνιο, η τροχιακή γωνιακή ορμή του ηλεκτρονίου και η κατεύθυνση του ανύσματος γωνιακής ορμής. Επιπλέον, και σύμφωνα με την αρχή αποκλεισμού του Pauli, κάθε ενεργειακή κατάσταση μπορεί να φιλοξενηθεί μόνο από δύο ηλεκτρόνια που έχουν αντίθετες τροχιές. Όταν τα μεμονωμένα άτομα ενωθούν σε ένα στερεό, δηλαδή όταν μειώνεται η διατομική απόσταση και τα ηλεκτρονικά επίπεδα αλληλεπικαλύπτονται, αρχίζει να γίνεται διάσπαση των ενεργειακών επιπέδων και τα επίπεδα ενέργειας μπορούν να θεωρηθούν ότι σχηματίζουν ενεργειακές ζώνες στο στερεό.

Όταν δύο άτομα έρχονται σε μικρή απόσταση, σύμφωνα με τη θεωρία των μοριακών τροχιακών, τα προϋπάρχοντα ατομικά τροχιακά καταργούνται και στη θέση τους δημιουργούνται νέα τροχιακά ισάριθμα με αυτά που καταργούνται. Αν πλησιάσουν πολλά άτομα ενός μετάλλου, τα ατομικά τροχιακά αντικαθίστανται από ένα σύνολο μοριακών τροχιακών, που ανήκουν σε αυτό το μόριο-κρύσταλλο με μικρές και παραπλήσιες μεταξύ τους τιμές ενέργειας που συγκροτούν τη ζώνη σθένους και από ένα άλλο σύνολο μοριακών τροχιακών με μεγάλες και παραπλήσιες μεταξύ τους τιμές ενέργειας που συγκροτούν τη ζώνη αγωγιμότητας.

Σε κάθε ενεργειακή ζώνη, τα επίπεδα ενέργειας είναι διακριτά, ενώ η διαφορά μεταξύ παρακείμενων καταστάσεων ενέργειας είναι απεριόριστα μικρή. Στα διαστήματα ισορροπίας, ο σχηματισμός ζώνης δεν μπορεί να συμβεί στις υποστοιβάδες των ηλεκτρονίων, που βρίσκονται πλησιέστερα στον πυρήνα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 11. Υπάρχουν περαιτέρω χάσματα μεταξύ γειτονικών ζωνών, ενώ το ηλεκτρόνιο δεν έχει ενέργεια εντός του ενεργειακού χάσματος.



Εικόνα 11: Σχηματική παράσταση της διεύρυνσης κάθε ατομικής ενεργειακής στάθμης σε μια ενεργειακή ζώνη ορισμένου εύρους καθώς η ενδοατομική απόσταση μικραίνει για να φτάσουμε στη χαρακτηριστική ενδοατομική απόσταση (διακεκομμένη γραμμή) του υλικού στην κατάσταση ισορροπίας.²⁸

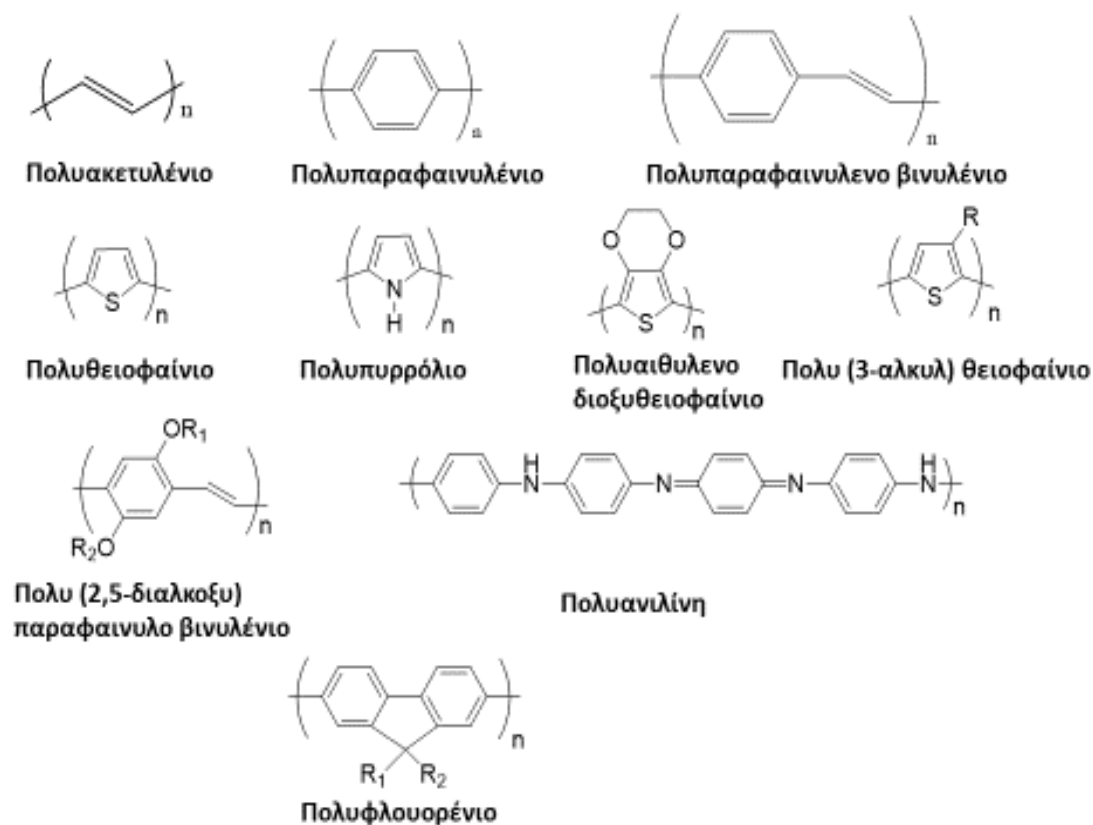
3.1.3.: Ημιαγώγιμα Πολυμερή

Τα ημιαγώγιμα πολυμερή είναι ένα είδος πολυμερών που έχει προσελκύσει ιδιαίτερα το ερευνητικό ενδιαφέρον καθώς εμφανίζουν τις ηλεκτρικές και θερμικές ιδιότητες που παραδοσιακά αποδίδονται σε μέταλλα και ημιαγωγούς, ενώ διατηρούν παράλληλα τις καλές μηχανικές ιδιότητες και την ευκολία στην επεξεργασία που χαρακτηρίζουν τα «κλασσικά» πολυμερικά υλικά.

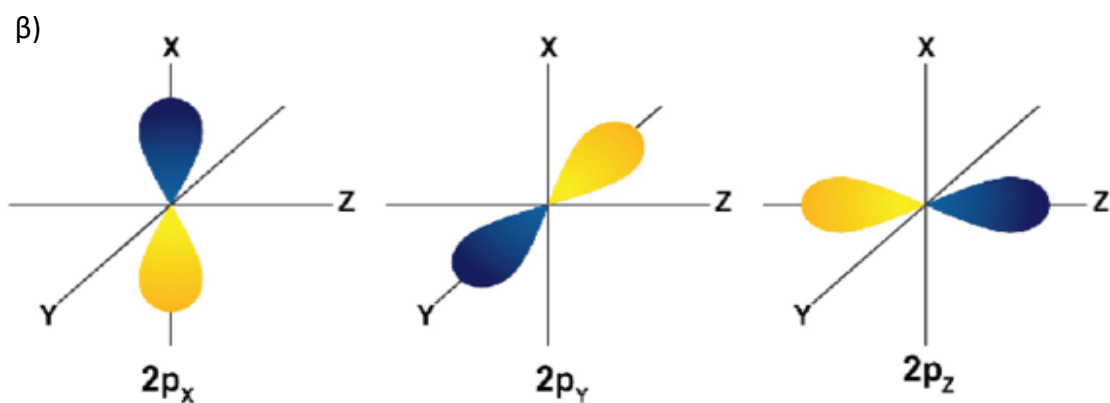
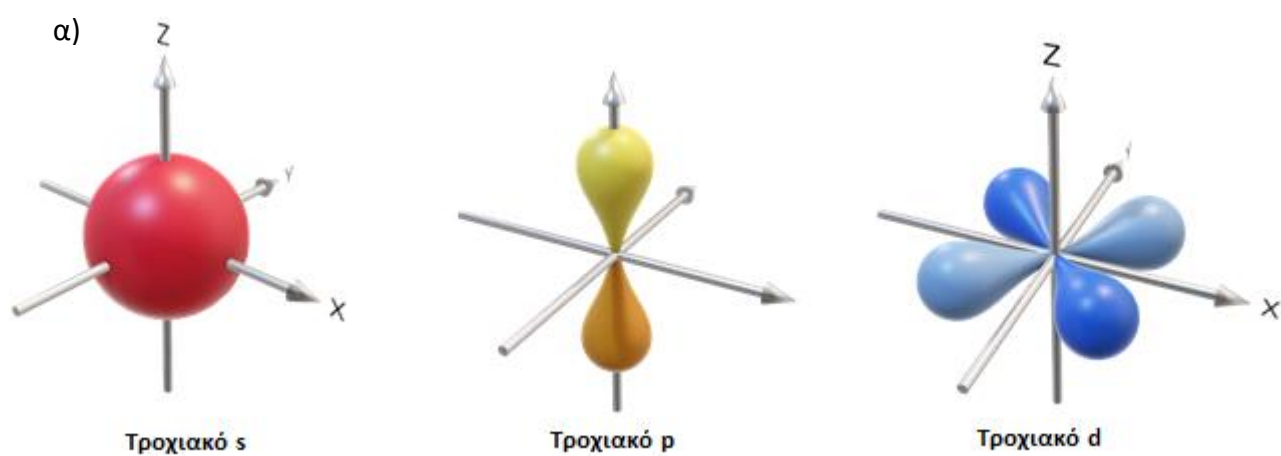
Τα ημιαγώγιμα πολυμερή αποτελούνται από ακόρεστες ή/και αρωματικές μονομερείς επαναλαμβανόμενες μονάδες, έτσι ώστε να υπάρχει εναλλαγή απλών και διπλών δεσμών και να δημιουργείται η συζυγία. Πολλά πολυμερή περιλαμβάνουν και άτομα αζώτου ή θείου στην κύρια πολυμερική αλυσίδα. Στην εικόνα 12 παρουσιάζονται διάφορες δομές ημιαγώγιμων πολυμερών που έχουν μελετηθεί όπως το πολυθειοφαίνιο, η πολυανιλίνη, η πολυπυρρόλη κ.α.

Επιπλέον πρέπει να γίνει αναφορά και να εξεταστεί ο χημικός δεσμός C-C έτσι ώστε να κατανοηθούν καλύτερα οι ιδιότητες των ημιαγώγιμων πολυμερών. Όπως είναι γνωστό ο άνθρακας έχει ηλεκτρονιακή διαμόρφωση $1s^2 2s^2 2p^2$ αφού διαθέτει ατομικό αριθμό $Z=6$. Ο άνθρακας έχει τέσσερα ηλεκτρόνια στην στοιβάδα σθένους (outershell) και δύο ηλεκτρόνια στον πυρήνα ($1s^2$). Τα ατομικά τροχιακά με χαρακτήρα s έχουν σφαιρική εικόνα και η απεικόνιση του τροχιακού αυτού καθώς και των p τροχιακών φαίνονται στην Εικόνα 13.³⁰

Με βάση τη θεωρία δεσμού σθένους, όταν κατά τη δημιουργία του δεσμού μεταξύ δύο ατόμων A και B, ένα τροχιακό σθένους του ατόμου A συγχωνεύεται εν μέρει με ένα τροχιακό σθένους του ατόμου B. Τότε λέμε ότι τα τροχιακά μοιράζονται μια περιοχή του χώρου ή ότι επικαλύπτονται. Καθώς το τροχιακό του ενός ατόμου επικαλύπτει το τροχιακό του άλλου, τα ηλεκτρόνια στα τροχιακά αυτά αρχίζουν να κινούνται γύρω από τα δύο άτομα. Επειδή τα ηλεκτρόνια έλκονται συγχρόνως και από τους δύο πυρήνες, τα άτομα αναγκαστικά πλησιάζουν το ένα το άλλο, δημιουργώντας αυτό που λέμε χημικό δεσμό. Η ισχύς του δημιουργούμενου δεσμού



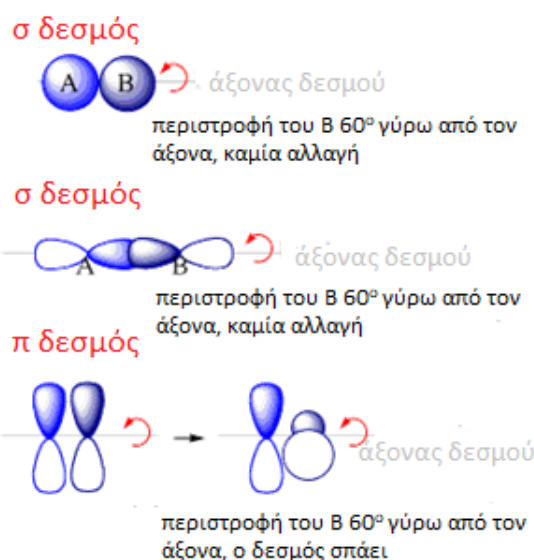
Εικόνα 12: Διάφορα Ημιαγώγιμα Πολυμερή



Εικόνα 13: Σχηματική απεικόνιση των α) s, p, d τροχιακών και β) των $2p_x$, $2p_y$, $2p_z$

εξαρτάται από την έκταση της επικάλυψης. Όσο μεγαλύτερη είναι η επικάλυψη, τόσο ισχυρότερος είναι ο δεσμός.

Όταν ενώνονται δύο s τροχιακά τότε δημιουργείται μια επικάλυψη s-s, η οποία αποτελεί ομοιοπολικό σ δεσμό. Γενικά, σ δεσμοί προκύπτουν με επικαλύψεις s-s, s-p και p-p ατομικών τροχιακών κατά τον άξονα που συνδέει τους πυρήνες των δύο συνδεόμενων ατόμων. Κατ' αυτή τη διεύθυνση εξασφαλίζεται η μεγαλύτερη δυνατή επικάλυψη. Αν τα δύο ατομικά τροχιακά είναι παράλληλα, δεν είναι δυνατόν να γίνει επικάλυψη αυτών κατά μήκος του άξονα που συνδέει τους πυρήνες των ατόμων. Στην περίπτωση αυτή έχουμε πλευρική επικάλυψη των αντίστοιχων ηλεκτρονιακών νεφών με αποτέλεσμα τη δημιουργία του π δεσμού. Στον π δεσμό ο άξονας, που συνδέει τους δύο πυρήνες των ατόμων, βρίσκεται σε επιφάνεια στην οποία δεν έχει πιθανότητα να υπάρχει το ηλεκτρονιακό νέφος (κομβική επιφάνεια). Η δημιουργία των δεσμών μέσω των τροχιακών μεταξύ δύο ατόμων A και B φαίνεται πιο αναλυτικά στο σχήμα Εικόνα 14.

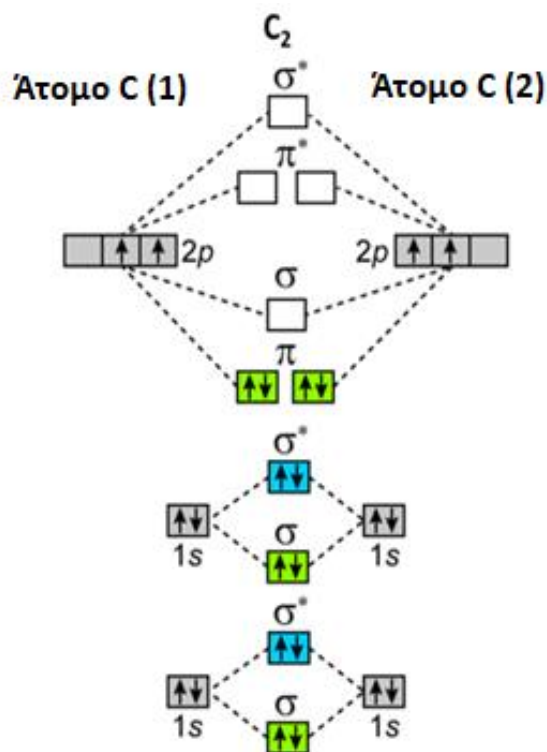


Εικόνα 14: Σχηματικό Παράδειγμα δύο ατόμων A και B ως προς δημιουργία σ και π δεσμού.

Πρέπει να αναφερθεί και η θεωρία μοριακών τροχιακών, η οποία είναι μια θεωρία της ηλεκτρονικής δομής των μορίων με βάση μοριακά τροχιακά, τα οποία μπορεί να εκτείνονται σε διαφορετικά άτομα ή και σε ολόκληρο το μόριο. Στη θεωρία αυτή, καθώς τα άτομα προσεγγίζουν το ένα το άλλο, τα τροχιακά τους επικαλύπτονται και σχηματίζουν μοριακά τροχιακά. Καθώς τα δύο ατομικά τροχιακά πλησιάζουν το ένα το άλλο και αρχίζουν να αλληλεπικαλύπτονται, υπάρχει μια μείωση στην καθαρή ενέργεια του συστήματος, επειδή τα ηλεκτρόνια σε κάθε άτομο τείνουν να προσελκύονται στον θετικό πυρήνα του άλλου ατόμου, καθώς και στον δικό τους πυρήνα. Όσο περισσότερο τα τροχιακά επικαλύπτονται, τόσο περισσότερο μειώνεται η ενέργεια, μέχρι που οι πυρήνες πλησιάσουν τόσο κοντά που αρχίζουν να απωθούν ο ένας τον άλλον. Το σημείο στο οποίο οι απωθητικές και οι ελκτικές δυνάμεις ισορροπούν, είναι αυτό που καθορίζει την απόσταση του δεσμού για έναν δεδομένο ομοιοπολικό δεσμό. Επιπλέον, στη θεωρία μοριακών τροχιακών, ο αριθμός των ατομικών τροχιακών που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή του ομοιοπολικού δεσμού πρέπει να ισούται με τον συνολικό αριθμό των μοριακών τροχιακών στο

μόριο. Μαθηματικά, το μοριακό τροχιακό είναι ένας γραμμικός συνδυασμός ατομικών τροχιακών (LCAO).

Η φύση της ένωσης του δεσμού άνθρακα-άνθρακα (C_2) μπορεί να περιγραφεί χρησιμοποιώντας τη Θεωρία Μοριακών Τροχιακών (ΘΜΟ), που μόλις περιγράφηκε παραπάνω. Η μοριακή τροχιακή περιγραφή αυτού του απλού ομοιοπολικού δεσμού παρουσιάζεται στο παρακάτω σχήμα (Εικόνα 15).



Εικόνα 15: Απεικόνιση των μοριακών τροχιακών του C_2 με βάση τη ΘΜΟ.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, έχουμε το σχηματισμό των σ και σ^* τροχιακών και των π και π^* τροχιακών με την ένωση των ατομικών τροχιακών. Η αλληλοεπικάλυψη, σύμφωνα με την κβαντομηχανική μπορεί να είναι είτε «αποτελεσματική», εάν οι διακυμάνσεις βρίσκονται σε φάση, είτε «καταστροφικές» εάν οι διακυμάνσεις είναι εκτός φάσης. Έτσι, αντίστοιχα, προκύπτουν τα δεσμικά και αντιδεσμικά τροχιακά.

3.2. Φωτονικά Υλικά και ιδιότητες

Η φωτονική είναι η φυσική επιστήμη της παραγωγής φωτός (φωτονίων), της ανίχνευσης και του χειρισμού μέσω εκπομπής, μετάδοσης, διαμόρφωσης, επεξεργασίας σήματος, μεταγωγής, ενίσχυσης και αίσθησης. Αν και καλύπτει όλες τις εφαρμογές του φωτός σε όλο το φάσμα του, οι περισσότερες φωτονικές εφαρμογές βρίσκονται στο εύρος του ορατού και υπέρυθρου φωτός. Ο όρος «φωτονική» αναπτύχθηκε από την κατασκευή των πρώτων ημιαγωγών εκπομπής φωτός με πρακτική εφαρμογή, οι οποίοι εφευρέθηκαν στις αρχές της δεκαετίας του 1960 και των οπτικών ινών που αναπτύχθηκαν τη δεκαετία του 1970.^{31,32}

Η εξέλιξη του τομέα αυτού σχετίζεται άμεσα με το φως και τα φωτόνια ενός συστήματος όπως υποδηλώνει και το όνομά του. Τα φωτονικά υλικά παρουσιάζουν πολλές ιδιότητες φωτοφυσικές και φωτοχημικές, όπως απορρόφηση και εκπομπή

στην περιοχή του ορατού φωτός και στο κοντινό υπέρυθρο ηλεκτρομαγνητικό φάσμα.

Οι ημιαγωγοί ως υλικά χρησιμοποιούνται πλέον ευρέως και αποτελούν μια σημαντική κατηγορία υλικών όσον αφορά εφαρμογές δημιουργίας και ανίχνευσης του φωτός, όπως στα LEDs, βιοαισθητήρες, βιοαπεικόνιση, φωτοβολταϊκά συστήματα κτλ.

3.2.1.: Συζυγιακά Πολυμερή^{27,28}

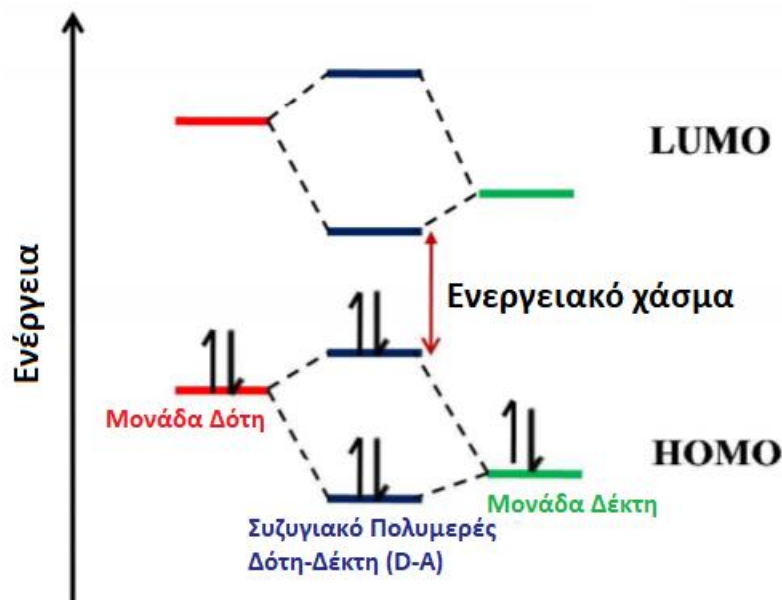
Στα προηγούμενα κεφάλαια, δημιουργήθηκε ένας νοητός χάρτης, του οποίου η εξερεύνηση μπορεί να οδηγήσει σε ένα κρυμμένο θησαυρό της επιστήμης. Ο χάρτης αυτός ξεκινάει με το ταξίδι στη Χημεία Πολυμερών, η οποία οδήγησε στα αγωγίμα πολυμερή και κατά συνέπεια σε συζυγιακά πολυμερή, τα οποία φαίνεται να κρύβουν «θησαυρούς» που πρέπει να ανακαλυφθούν.

Συνεπώς, ο λόγος που εμφανίζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον τα συζυγιακά πολυμερή (Conjugated Polymers, CPs) οφείλεται στο π-συζυγιακό σύστημα που διαθέτουν κατά μήκος της πολυμερικής αλυσίδας και κατά συνέπεια, αυτή η εκτεταμένη συζυγία του προσδίδει τις οπτικές και ηλεκτρικές ιδιότητες στα πολυμερή αυτά. Επιπλέον, είναι ημιαγωγίμα υλικά, όπως ήδη αναφέρθηκε, και αυτό συμβάλει στον συνδυασμό των οπτοηλεκτρονικών ιδιοτήτων ενός ανόργανου ημιαγωγού με τις εξαιρετικές μηχανικές ιδιότητες του πολυμερούς. Τα συζυγιακά πολυμερή έχουν πολλά προφανή πλεονεκτήματα έναντι ανόργανων υλικών και μικρών μορίων οργανικών υλικών, όπως ελαφρύ βάρος, χαμηλό κόστος και ευκαμψία. Τα συζυγιακά πολυμερή μπορούν να επιτύχουν ηλεκτρικές ιδιότητες συγκρίσιμες με μη κρυσταλλικούς ανόργανους ημιαγωγούς. Ωστόσο, οι πολύπλοκες χημικές και δομικές ιδιότητες των συζυγιακών πολυμερών δεν είναι καθόλου αλλοιώσιμες και μοιάζουν με αυτές των βιομακρομορίων.

3.2.2.: Φαινόμενο Δότη-Δέκτη (Donor-Acceptor, D-A)

Αρχικά, μια ομάδα ατόμων η οποία προσφέρει ηλεκτρόνια στο υπόλοιπο σύστημα ονομάζεται δότης (donor) ηλεκτρονίων, ενώ αυτή που δέχεται ηλεκτρόνια ονομάζεται δέκτης (acceptor).

Σε ένα πολυμερές κατά την απορρόφηση ενός φωτονίου, ένα ηλεκτρόνιο από το υψηλότερα κατειλημμένο μοριακό τροχιακό (HOMO) του πολυμερούς υφίσταται φωτοδιέγερση και έτσι μετακινείται στο χαμηλότερα μη καταλαμβανόμενο μοριακό τροχιακό (LUMO) του πολυμερούς. Το ενεργειακό χάσμα του πολυμερούς, δηλαδή μεταξύ των τροχιακών HOMO και LUMO, καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την ενέργεια και την ποσότητα των φωτονίων που μπορεί να απορροφήσει το πολυμερές (Εικόνα 16).³³ Δηλαδή όσο πιο μικρό είναι αυτό, πλησιάζουν τα δύο αυτά τροχιακά διευκολύνεται την μεταφορά του ηλεκτρονίου από το HOMO στο LUMO και αντίστροφα.



Εικόνα 16: Ενεργειακά επίπεδα των μονάδων Δότη και Δέκτη και του συζυγιστικού πολυμερούς D-A)³³

Ένας αποτελεσματικός τρόπος για τον συντονισμό του ενεργειακού χάσματος ενός πολυμερούς είναι να του δοθεί μια μοριακή δομή στην οποία μια πλούσια σε ηλεκτρόνια μονάδα δότη (D) είναι συζευγμένη με μια μονάδα δέκτη ηλεκτρονίων (A), η οποία χαρακτηρίζεται ως "συζυγιστικό πολυμερές D - A". Μια τέτοια συζυγιστική δομή D - A προκαλεί ενδομοριακή μεταφορά φορτίου (Intramolecular Charge Transfer, ICT) μεταξύ των μονάδων D και A, με την ισχύ της ICT να εξαρτάται με τη σχετική συγγένεια των ηλεκτρονίων των δύο μονάδων.

Έχει γίνει εκτενή έρευνα στον τομέα των φωτοβολταϊκών για πολλά τέτοια πολυμερή με φαινόμενο D-A λόγω της ανάγκης να φτιαχτούν ημιαγωγιμα πολυμερή με χαμηλό ενεργειακό φάσμα και διάφορες άλλες ιδιότητες, όπως σταθερότητα, θερμική αντοχή κτλ.³⁴ Παρ' όλα αυτά τέτοιου είδους πολυμερή είναι εξαιρετικά χρήσιμα και σημαντικά και για βιολογικές εφαρμογές, όπως η Βιοαπεικόνιση, διότι χαρακτηρίζονται από εξαιρετικές οπτικές ιδιότητες, οι οποίες αποδεικνύονται σημαντικές για τεχνικές απορρόφησης, φθορισμού κτλ.³⁵⁻³⁷

3.2.3.: Νανοσωματίδια Συζυγιστικών Πολυμερών^{19,20,38}

Έπειτα από αναφορά στους τομείς της Νανοτεχνολογίας και των Συζυγιστικών Πολυμερών, πρέπει να αναφερθούμε και στα Νανοσωματίδια Συζυγιστικών Πολυμερών (Conjugated Polymer Nanoparticles, CPNs). Αναφέραμε προηγουμένως

ότι τα συζυγιακά πολυμερή μοιάζουν με βιομακρομόρια και για το λόγο αυτό, τα τελευταία χρόνια, γίνεται συζήτηση και μεγάλη έρευνα για εφαρμογή σαν διαγνωστικά ή/και θεραπευτικά υλικά με τη μορφή νανοσωματιδίων (Nanoparticles, NPs) σε πολλές ασθένειες, όπως ο καρκίνος.

Τα νανοϋλικά αυτά προσφέρουν μεγάλο εύρος πλεονεκτημάτων στην έρευνα λόγω των ιδιοτήτων τους. Αρχικά, η σύνθεση των νανοσωματιδίων είναι μία πολύ εύκολη διεργασία και καθόλου χρονοβόρα. Επιπλέον, διαθέτουν σε ένα μεγάλο βαθμό τις εξαιρετικές οπτικοηλεκτρονικές ιδιότητες των συζυγιακών πολυμερών. Πολλές συνεχιζόμενες έρευνες επικεντρώνονται στην ανάπτυξη οργανικών ιχνηθετών απεικόνισης που συνδυάζουν υψηλή ένταση φθορισμού, εξαιρετική φωτοσταθερότητα, αντοχή στη φωτολεύκανση, υψηλή αναλογία σήματος ως προς το θόρυβο και χαμηλή κυτταροτοξικότητα. Αυτά είναι χαρακτηριστικά που τα κάνουν ιδανικά ως υποψήφια υλικά για βιοαπεικόνιση. Λόγω της εύκολης τροποποίησης που μπορεί να γίνει σε αυτά, προσκολλώντας και διάφορα άλλα μόρια, συνήθως φάρμακα ή αντιμικροβιακά, τα καθιστά και ιδανικά για θεραπευτικά ταυτόχρονα ή ως μεταφορείς των φαρμάκων (nanocarriers) στον επιθυμητό στόχο.

Σε αρχικό στάδιο, λοιπόν, η έρευνα και χρησιμότητά τους επικεντρώθηκε στα οργανικά φωτοβολταϊκά. Αργότερα, λόγω των παραπάνω ιδιοτήτων τους επεκτάθηκε η μελέτη τους ως βιολογικών ιχνηθετών στην βιοαπεικόνιση. Το φάσμα απορρόφησής τους με βάση τη δομή μπορεί να κυμανθεί από το ορατό φάσμα μέχρι και την περιοχή της υπέρυθρης ακτινοβολίας. Ωστόσο, τα συζυγιακά πολυμερή είναι, συνήθως, υδρόφοβα και αυτό καθιστά δύσκολη τη διάλυσή τους σε νερό. Παρ' όλα αυτά, μέσω των μεθόδων της νανοκαταβύθισης και του εγκλωβισμού, οι οποίες είναι και μερικοί από τους τρόπους σύνθεσης των νανοσωματιδίων, καταφέρνουν να τα κάνουν διαλυτά. Υπάρχουν βέβαια και άλλες τεχνικές σύνθεσης των νανοσωματιδίων αυτών όπως μικρογαλακτωματοποίηση και αυτό-οργάνωση.

Επιπρόσθετα, υπάρχουν και πολλές ερευνητικές ομάδες, οι οποίες συνθέτουν συζυγιακά πολυμερή με διαφορές πολικές ομάδες ή αλυσίδες, τα οποία είναι περισσότερο υδατοδιαλυτά και ονομάζονται Υδατοδιαλυτά Συζυγιακά Πολυμερή (Water-Soluble Conjugated Polymers, WSCPs).³⁹ Αυτά τα πολυμερή έχουν το πλεονέκτημα ότι διαλύεται περισσότερη ποσότητα χρωμοφόρου σε μορφή νανοσωματιδίων στο νερό απ' ότι τα υδρόφοβα.

Όλα αυτά τα διάφορα νανοσωματίδια συζυγιακών πολυμερών που βρίσκονται υπό μελέτη έχουν αποδείξει ότι είναι ιδανικοί υποψήφιοι διαγνωστικών ή/και θεραπευτικών υλικών σε διάφορες τεχνικές που έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια όπως η απεικόνιση μέσω φθορισμού, απεικόνιση Raman, Φωτοακουστική απεικόνιση, αλλά και στην φωτοδυναμική και φωτοθερμική τεχνική θεραπείας, καθώς και σε συνδυασμό των παραπάνω τεχνικών. Αυτό συμβαίνει γιατί κάθε διαφορετική ομάδα νανοσωματιδίων συζυγιακών πολυμερών εμφανίζει και διαφορετικά χαρακτηριστικά ανάλογα με τη χημική δομή του πολυμερούς, αλλά και κάποιες φορές ο τρόπος κατασκευής τους ίσως να παίξει και ρόλο στα χαρακτηριστικά αυτά.

3.3.: Βιοαπεικόνιση και Θεραπεία μέσω CPNs²⁰

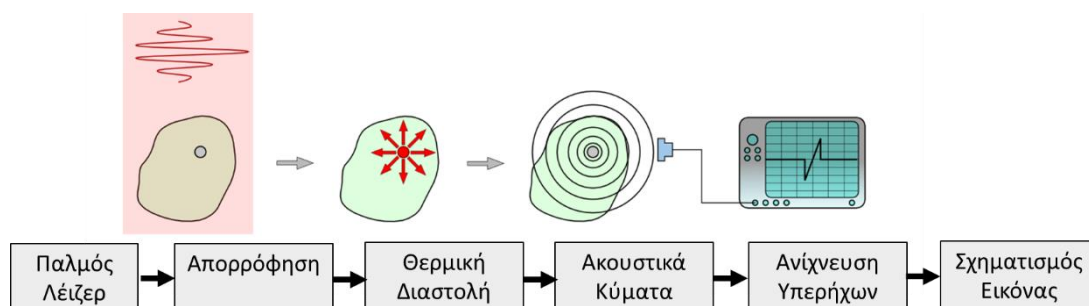
Όπως περιεγράφηκε στο κεφάλαιο 2.6., υπάρχουν κάποιες τεχνικές βιοαπεικόνισης και θεραπείας, πάνω στις οποίες βρίσκουν εφαρμογή τα CPNs και περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω.

3.3.1.: Απεικόνιση μέσω φθορισμού

Η μέθοδος του φθορισμού στην βιοαπεικόνιση έχει αποδειχθεί ως μία από τις καλύτερες μεθόδους για διάγνωση σε καρκινικά κύτταρα. Λαμβάνοντας υπόψη ότι διάφορα εμπορικά οπτικά όργανα έχουν κάθε πηγή διέγερσης, ένα στοχευμένο φθορίζον υλικό μπορεί να ταιριάζει με διαφορετικές πηγές διέγερσης για να δείξει διαφορετικές εκπομπές. Τα φθορίζοντα CPs, με πολλές επαναλαμβανόμενες δομικές μονάδες απορρόφησης, διαθέτουν εξαιρετικά ισχυρή ικανότητα συλλογής φωτός. Εάν υπάρχει ένα μόριο αποδέκτη στο σύστημα ανίχνευσης, η μεταφορά ενέργειας διέγερσης κατά μήκος ολόκληρης της σπονδυλικής στήλης ενός CP δότη στον αποδέκτη θα οδηγήσει σε ένα ενισχυμένο σήμα (γνωστό ως φαινόμενο μοριακού σύρματος), αυξάνοντας έτσι σημαντικά την ευαισθησία της απεικόνισης και της διάγνωσης. Για το λόγο αυτό τα CPNPs τα τελευταία χρόνια, έχουν προκαλέσει μεγάλη επιστημονική προσοχή λόγω των μοναδικών τους πλεονεκτημάτων. Έτσι, έχουν αρχίσει να αναπτύσσονται ραγδαία και πλέον αποτελούν μια κατηγορία υποσχόμενων φθορίζοντων υλικών.

3.3.2.: Φωτοακουστική απεικόνιση

Η φωτοακουστική απεικόνιση (Photoacoustic Imaging, PAI) είναι μια βιοϊατρική μορφή απεικόνισης που βασίζεται στο φωτοακουστικό φαινόμενο. Στην PAI, παλμοί λέιζερ μεταδίδονται σε βιολογικούς ιστούς. Ορισμένη από την δοθείσα ενέργεια θα απορροφηθεί και θα μετατραπεί σε θερμότητα, οδηγώντας σε παροδική θερμοελαστική επέκταση και επομένως σε υπερηχητική εκπομπή ευρείας ζώνης (δηλαδή MHz). Τα παραγόμενα υπερηχητικά κύματα ανιχνεύονται με υπερηχητικούς μετατροπείς και στη συνέχεια αναλύονται για να παράγουν εικόνες. Ως αποτέλεσμα, το μέγεθος της εκπομπής υπερήχων (δηλαδή φωτοακουστικού σήματος), το οποίο είναι ανάλογο με την τοπική εναπόθεση ενέργειας, αποκαλύπτει φυσιολογικά ειδική αντίθεση οπτικής απορρόφησης. Μπορούν να σχηματιστούν 2D ή 3D εικόνες των στοχευμένων περιοχών (Εικόνα 17).⁴⁰



Εικόνα 17: Απεικόνιση της αρχής λειτουργίας Φωτοακουστικής Απεικόνισης.⁴⁰

Τα συζυγιακά πολυμερή με απορρόφηση και εκπομπή κοντά στην υπέρυθρη ακτινοβολία έχουν διερευνηθεί όχι μόνο για την απεικόνιση μέσω φθορισμού, αλλά

και ως φωτοακουστικοί ανιχνευτές και ως φωτοθερμικά μέσα για την αφαίρεση όγκου. Σε αντίθεση με τη συμβατική οπτική απεικόνιση (π.χ. φθορισμό ή απεικόνιση φωταύγειας), η φωτοακουστική απεικόνιση (Photoacoustic Imaging, PAI) είναι μια ισχυρή μέθοδος με υψηλή ανάλυση και μεγάλο βάθος διείσδυσης λόγω της ανίχνευσης υπερήχων που παράγονται με λέιζερ αντί για φωτόνια. Στη βιολογία, τα ενδογενή μόρια όπως η αιμοσφαιρίνη, η δεοξυαιμοσφαιρίνη και η μελανίνη μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ιχνηθέτες για την απεικόνιση του PAI των αιμοφόρων αγγείων, του εγκεφάλου, και των καρκινικών όγκων. Ωστόσο, απορροφούν το φως στην ορατή περιοχή, γεγονός που περιορίζει την ευαισθησία και την ανάλυση της απεικόνισης λόγω της σκέδασης του φωτός.

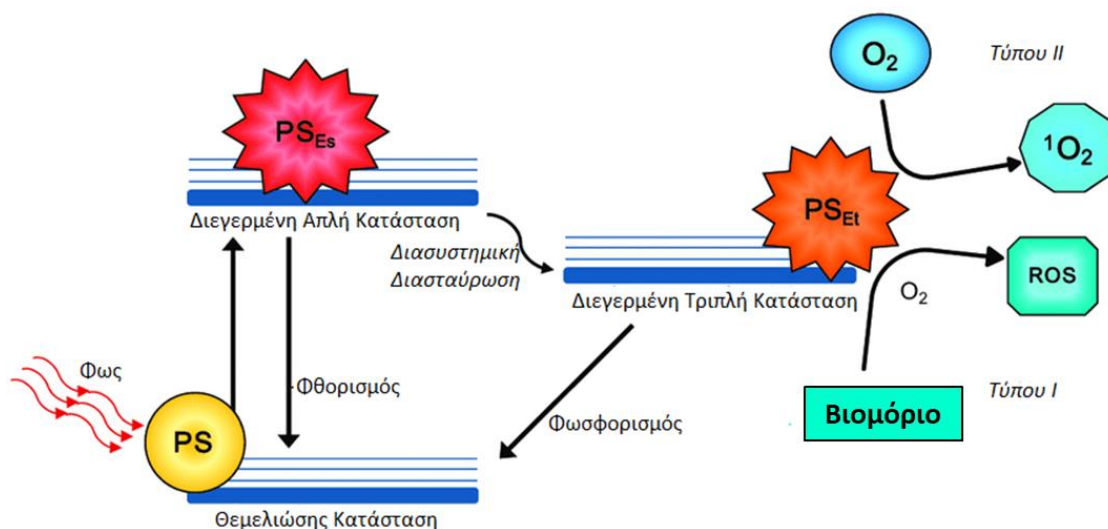
3.3.3.: Απεικόνιση μέσω Raman

Εκτός από τις προαναφερθείσες συμβατικές τεχνικές οπτικής απεικόνισης (π.χ. φθορισμό ή απεικόνιση φωταύγειας) και PA απεικόνιση, η απεικόνιση μέσω Raman έχει αναδειχθεί ως μια άλλη τεχνική απεικόνισης υψηλής ιχνηθέτησης για βιοαπεικόνιση. Ωστόσο, πολλοί ιχνηθέτες για την απεικόνιση Raman δεν θα μπορούσαν να επιτύχουν αποτελέσματα υψηλής ιχνηθέτησης που προκύπτουν από τη μικρή διατομή σκέδασης και την παρεμβολή σήματος από το υπόβαθρο. Ως εκ τούτου, είναι επιτακτικό να σχεδιαστούν και να συνδεθούν περισσότερα δραστικά υλικά Raman με μεγάλη διατομή σκέδασης Raman και ισχυρό σήμα στη σιωπηλή περιοχή ($1800\text{-}2800\text{cm}^{-1}$) των κυττάρων για την βελτίωση της απεικόνισης μέσω Raman σε ζωντανό σύστημα. Παρόλο που τα CPNPs έχουν εφαρμοστεί σε τόσες πολλές μορφές απεικόνισης, η απεικόνιση Raman με βάση τα CPNPs βρίσκεται ακόμα σε πρώιμο στάδιο.

3.3.4.: Φωτοδυναμική Θεραπεία

Η φωτοδυναμική θεραπεία (Photodynamic Therapy, PDT) είναι μια καλά εδραιωμένη μέθοδος κλινικής θεραπείας για τον καρκίνο και άλλες ασθένειες. Στην PDT, χρειάζεται ένας φωτοευαισθητοποιητής, ο οποίος μεταβαίνει στην απλή κατάσταση διέγερση με απορρόφηση του φωτός, ακολουθούμενη από το σχηματισμό της διεγερμένης τριπλής κατάστασης μέσω διασυστημικής διασταύρωσης. Ο φωτοευαισθητοποιητής στην τριπλή κατάσταση μεταφέρει στη συνέχεια την ενέργεια του στο οξυγόνο της θεμελιώδους κατάστασης ($^3\text{O}_2$), με αποτέλεσμα την παραγωγή της απλής κατάστασης του οξυγόνου ($^1\text{O}_2$) που είναι γνωστό ότι προκαλεί μη αναστρέψιμη βλάβη σε νουκλεϊκά οξέα, ένζυμα και άλλα κυτταρικά συστατικά και οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης. (Εικόνα 18).⁴¹ Τα CPNPs βρίσκουν και σε αυτή τη θεραπεία εφαρμογή διότι χρησιμοποιούνται ως φωτοευαισθητοποιητές. Έτσι, παρέχουν αυξημένη αποτελεσματικότητα

παραγωγής οξυγόνου και αποτελεσματική ενεργότητα της φωτοδυναμικής θεραπείας σε ζώντα καρκινικά κύτταρα.



Εικόνα 18: Σχηματική απεικόνιση φωτοδυναμικής θεραπείας με βάση το διάγραμμα Jablonski.⁴¹

3.4.5.: Φωτοθερμική θεραπεία

Η φωτοθερμική θεραπεία (Photothermal therapy, PTT) βασίζεται στο φωτοθερμικό φαινόμενο των φωτοθερμικών ιχνηθετών μεταγωγής (Photothermal Transduction Agents, PTAs), οι οποίοι μπορούν να συλλέξουν την ενέργεια τους από το φως και να την μετατρέψουν σε θερμότητα έτσι ώστε να αυξηθεί η θερμοκρασία του περιβάλλοντος χώρου και με αυτό τον τρόπο να προκαλέσουν το θάνατο των καρκινικών κυττάρων. Η PTT προσφέρει ορισμένα πλεονεκτήματα, όπως τη χρήση εξωτερικής ακτινοβολίας λέιζερ με συγκεκριμένη δοσολογία που επιτρέπει την ακριβή στόχευση σε όγκους, ώστε να ελαχιστοποιηθεί η βλάβη στους περιβάλλοντες υγιείς ιστούς, καθώς και βαθύτερη διείσδυση, λιγότερες ζημιές εξαιτίας του φωτός NIR και είναι ανεξάρτητη από το οξυγόνο. Εν ολίγοις, η PTT είναι μια εξαιρετικά αποτελεσματική και μη επεμβατική θεραπεία που μπορεί να εξαλείψει διάφορους τύπους καρκίνων.

Πρόσφατα, τα CPNPs αναπτύχθηκαν ως πιθανοί PTT ιχνηθέτες λόγω των μοναδικών ιδιοτήτων τους, όπως η καλή βιοσυμβατότητα, ο μεγάλος συντελεστής απορρόφησης και η εξαιρετική φωτοσταθερότητα.

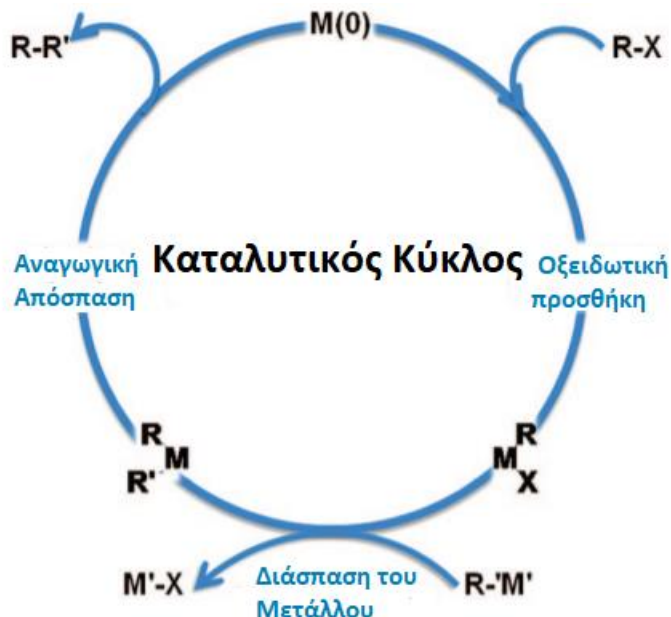
Κεφάλαιο 4: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

4.1.:Σύνθεση Συζυγιακών Πολυμερών

Η σύνθεση συζυγιακών πολυμερών μπορεί να επιτευχθεί με 2 διαφορετικούς τρόπους, είτε χημικά είτε ηλεκτροχημικά.^{42,43} Η επιλογή ενός από τους δύο εξ αυτών τρόπων είναι σημαντική διότι οι ιδιότητες των υλικών που θα προκύψουν θα εξαρτηθούν από αυτόν.

Χημικώς, η σύνθεση συζυγιακών πολυμερών μπορεί να γίνει μέσω οργανομεταλλικών συζεύξεων, δηλαδή σε καταλυτικές αντιδράσεις αρωματικής σύζευξης δεσμού άνθρακα - άνθρακα (C-C) ή μέσω επεξεργασίας με κάποιο κατάλληλο οξειδωτικό. Γενικά, η αντίδραση αρωματικής σύζευξης περιλαμβάνει μία αντίδραση οξειδωτικής προσθήκης καταλυόμενη από μέταλλο μετάπτωσης κατά μήκος του δεσμού Cs-X ενός ηλεκτρονιόφιλου και στη συνέχεια μετάδοση με ένα οργανομεταλλικό πυρηνόφιλο κύριας ομάδας, ακολουθούμενο από ένα στάδιο αναγωγικής απομάκρυνσης που οδηγεί στο σχηματισμό δεσμού άνθρακα-άνθρακα. Παράλληλα ο ενεργός καταλύτης αναγεννάται (Εικόνα 19).⁴⁴ Υπάρχουν διάφοροι τύποι αντιδράσεων σύζευξης, οι οποίοι χωρίζονται με βάση το μέταλλο της οργανομεταλλικής ομάδας (Εικόνα 20).⁴⁵ Κάποιες από αυτές είναι οι εξής:

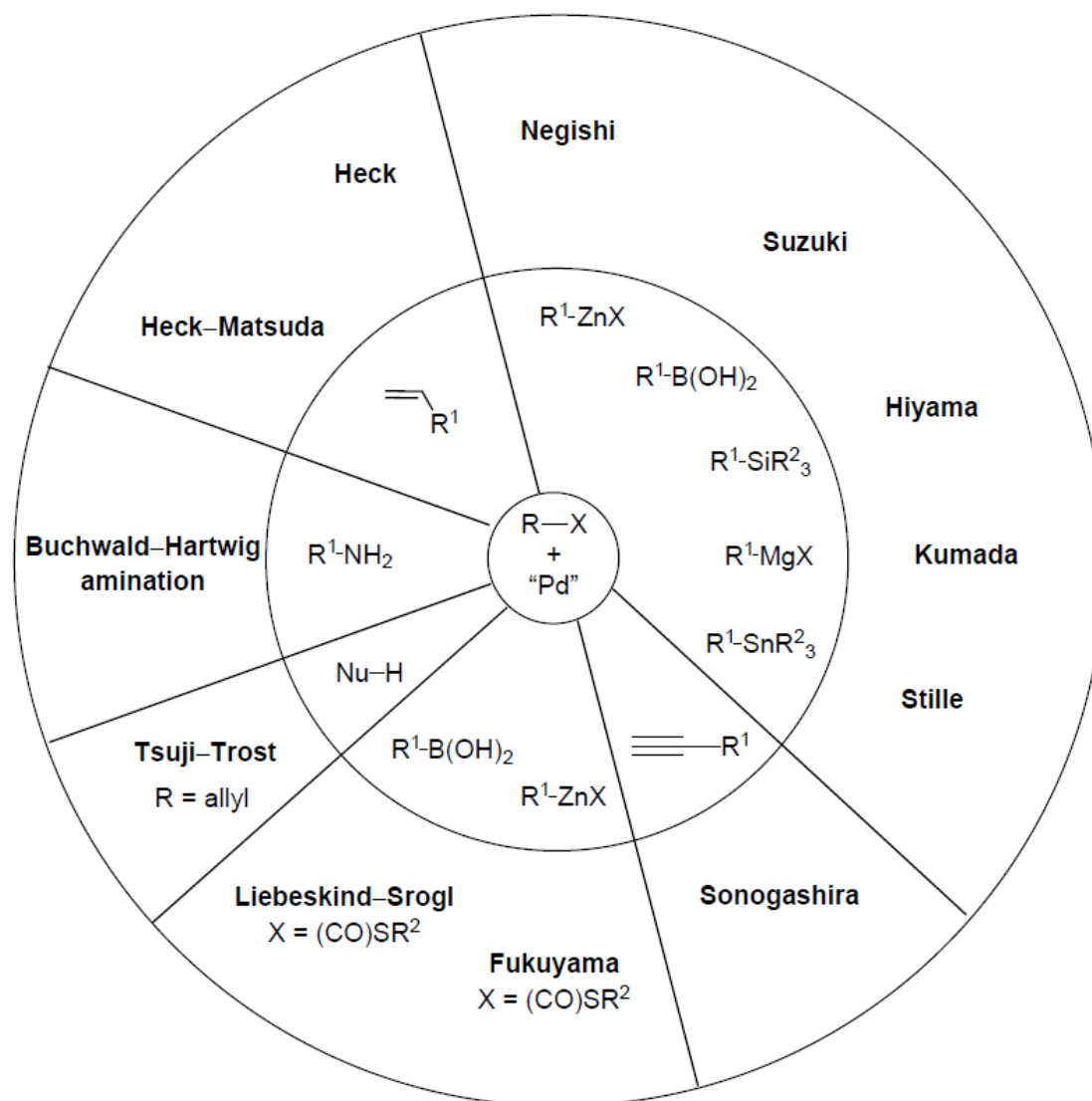
- Τα οργανοκασσιτερικά (Stille)
- Τα οργανοβοράνια (Suzuki-Miyaura)
- Τα οργανομαγνησιακά (Kumada)
- Τα οργανοσιλάνια ή οργανοπυρίτια (Hiyama)
- Τα οργανοψευδαργυρικά (Negishi).



Εικόνα 19: Καταλυτικός κύκλος αντιδράσεων μετάβασης-μετάλλου-καταλύτη.⁴⁴

Οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενοι καταλύτες μετάλλου είναι σύμπλοκα νικελίου ή παλλαδίου, αν και έχουν χρησιμοποιηθεί και άλλα μέταλλα. Οι πιο κοινές αντιδράσεις σύζευξης για σύνθεση συζυγιακών πολυμερών είναι οι συζεύξεις Suzuki και Stille, οι οποίες χρησιμοποιούν σαν καταλύτη ενώσεις παλλαδίου και είναι οι πιο

αποτελεσματικές και ευρέως χρησιμοποιούμενες μέθοδοι για την παρασκευή εναλλακτικών συμπολυμερών.



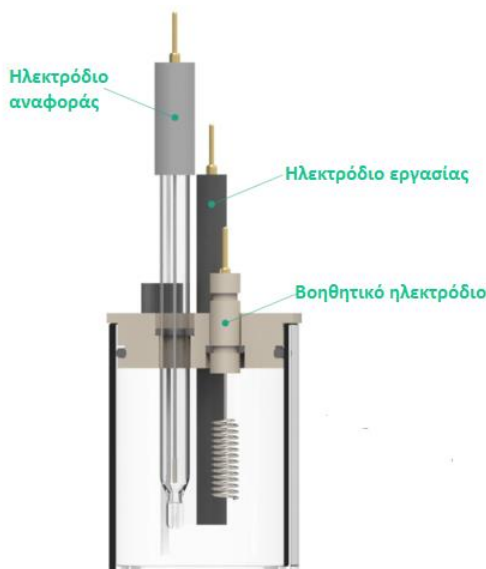
Εικόνα 20: Συνολική απεικόνιση των διάφορων αντιδράσεων αρωματικής σύζευξης που καταλύονται με Pd, όπου (R=οργανική ομάδα, X=άτομο αλογόνου ή ψευδοαλογονίδιο (πχ F_3CSO_2O , Tf), "Pd"=καταλύτης Pd, Nu= νουκλεόφιλο όπως ενολικό ή αμίνη).⁴⁵

Ηλεκτροχημικά, τα τελευταία χρόνια ο ηλεκτροχημικός πολυμερισμός γίνεται σε κυψελίδα 3 ηλεκτροδίων. Σε μια τέτοια συσκευή ένα ηλεκτρόδιο αναφοράς μετρά και ελέγχει το δυναμικό του ηλεκτροδίου εργασίας, ενώ το βοηθητικό ηλεκτρόδιο περνά όλο το απαιτούμενο ρεύμα για την εξισορρόπηση του παρατηρούμενου ρεύματος στο ηλεκτρόδιο εργασίας (Εικόνα 21).⁴⁶ Το ηλεκτρόδιο εργασίας λειτουργεί ως υπόστρωμα για την ηλεκτρο-εναπόθεση του πολυμερούς. Είναι απαραίτητο τη στιγμή που το πολυμερές εναποτίθεται με οξειδωτική διεργασία, να μην γίνεται οξείδωση του ηλεκτροδίου. Επομένως, πρέπει να χρησιμοποιούνται αδρανή ηλεκτρόδια όπως Pt, Au, SnO₂, ITO (Indium Tin Oxide) και ανοξείδωτο υπόστρωμα. Το βοηθητικό ηλεκτρόδιο είναι κατασκευασμένο από υαλώδη άνθρακα ή μεταλλικό φύλλο, συνήθως Pt ή Au. Το ηλεκτρόδιο αναφοράς είναι συνήθως ένα κορεσμένο ηλεκτρόδιο καλομέλανος (SCE) ή Ag/AgCl σύστημα (χρήσιμο για υδατικούς και μη υδατικούς διαλύτες). Κατά τη διάρκεια του ηλεκτροχημικού πολυμερισμού διοχετεύεται ρεύμα μέσω διαλύματος του μονομερούς και λαμβάνει χώρα η

εναπόθεση του πολυμερούς (στην άνοδο). Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η σωστή εναπόθεση του πολυμερούς, πρέπει να ληφθούν υπόψη οι ακόλουθες πέντε μεταβλητές:

- Χρόνος και θερμοκρασία εναπόθεσης
- Τύπος διαλύτη (υδατικός ή οργανικός διαλύτης) και καθαρότητα
- Τύπος ηλεκτρολύτη
- Σύστημα ηλεκτροδίων
- Φορτίο εναπόθεσης

Όλοι αυτοί οι παράμετροι καθορίζουν τη μορφολογία του πολυμερούς σε φιλμ και τις μηχανικές και ηλεκτρικές του ιδιότητες που καθορίζουν τις τελικές ιδιότητες και τη χρησιμότητά του.



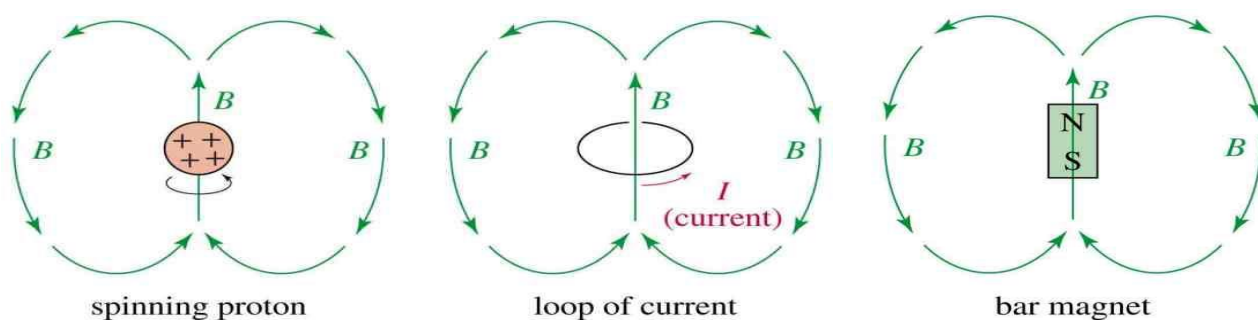
Εικόνα 21: Κυψελίδα 3 ηλεκτροδίων.⁴⁶

4.1.2.: Χαρακτηρισμός Συζυγιακών Πολυμερών

Όταν τα συζυγιακά πολυμερή συντεθούν τότε πρέπει να γίνει ένας χαρακτηρισμός αυτών, όπως και για όλες τις ενώσεις που συντίθενται έπειτα από διάφορες χημικές αντιδράσεις. Στα συζυγιακά πολυμερή μπορεί να γίνει αρχικά ένα τεστ διαλυτότητας, δηλαδή σε ποιον ή/και ποιους διαλύτες έχουν τη δυνατότητα να διαλύονται πλήρως. Έπειτα πρέπει να γίνει Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance ή NMR) και πιο συγκεκριμένα, πρωτονίου ή ^1H -NMR καθώς και άνθρακα ή ^{13}C -NMR. Μία επιπλέον τεχνική χαρακτηρισμού των πολυμερών είναι η Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγεθών (Size-exclusion chromatography, SEC) ή Χρωματογραφία Διαχωρισμού μέσω Πηκτών (Gel Permeation Chromatography, GPC), φασματοσκοπία Μοριακής Απορρόφησης στο υπεριώδες/ορατό (UV-Vis), φασματοσκοπία Φθορισμού. Τέλος, αν μιλάμε για ημιαγώγιμα υλικά, μία ακόμα απαραίτητη τεχνική είναι η Κυκλική Βολταμετρία (Cyclic Voltammetry, CV). Για αυτές τις τεχνικές θα γίνει αναλυτικότερη περιγραφή παρακάτω.

4.1.2.1: Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance ή NMR)

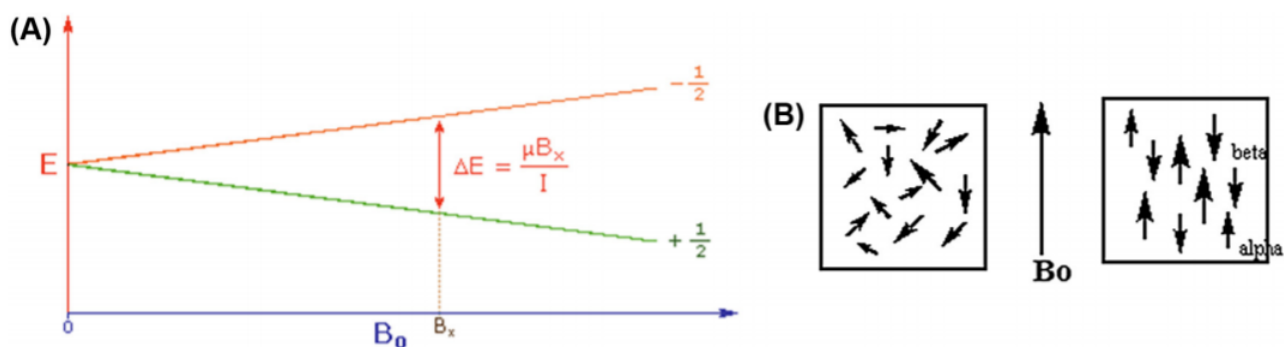
Γενικά, η φασματοσκοπία πυρηνικού συντονισμού είναι μία φασματοσκοπική τεχνική που δίνει πληροφορίες για τον αριθμό και τους τύπους των ατόμων σε ένα μόριο. Αποτελεί μία από τις σημαντικότερες τεχνικές χαρακτηρισμού διαφόρων χημικών οργανικών και ανόργανων ενώσεων και εξετάζει την ηλεκτρονική δομή ενός μορίου και ιδιοτήτων διαφόρων χημικών ειδών. Οι συχνότητες των μεταβάσεων NMR είναι τυπικά στην περιοχή των 10-1000 MHz, και οι πυρήνες των ατόμων ανιχνεύονται από αυτήν την ακτινοβολία. Για την τεχνική αυτή είναι απαραίτητο να αναφερθούν 3 σημαντικά θέματα: η φύση των πυρήνων, η περιστροφή και οι μαγνητικές ιδιότητες των πυρήνων. Οι θετικοί φορτισμένοι πυρήνες περιστροφής διαθέτουν τόσο μαγνητική ροπή όσο και μαγνητικό πεδίο ταυτόχρονα, και ένας πυρήνας φορτισμένος με περιστροφή συμπεριφέρεται ως ένας μαγνήτης μικροσκοπικής ράβδου. Επομένως, ο πιο πιθανός προσανατολισμός μπορεί να



Εικόνα 22: Φορτισμένος πυρήνας που περιστρέφεται με γωνιακή συχνότητα παράγει μαγνητικό πεδίο.

καθοριστεί με την επίδραση ενός εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, προσανατολισμένου κατά μήκος του άξονα περιστροφής όπως φαίνεται στην εικόνα 22.

Εφαρμόζεται ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο στο πυρηνικό spin, που έχει μια πυρηνική μαγνητική ροπή, και αναμφίβολα, διαφορετικές μαγνητικές δυναμικές ενέργειες μπορούν να προκύψουν από διαφορετικές καταστάσεις του spin. Η μετάβαση μεταξύ των καταστάσεων περιστροφής δημιουργείται από ένα κατάλληλο σήμα ραδιοσυχνοτήτων και η πόλωση του spin μπορεί επίσης να προκληθεί από το



Εικόνα 23: (Α) Κατάσταση περιστροφής κάτω από το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο B_0 , (Β) Ευθυγράμμιση πυρήνα κάτω από το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο (πυρήνας άλφα κατάστασης ευθυγραμμισμένος με τον νότιο πόλο του μαγνήτη και νότιο πόλο του πυρήνα με τον βόρειο πόλο του μαγνήτη).⁴⁷

στατικό μαγνητικό πεδίο. Ως εκ τούτου, μερικά spin τοποθετούνται στην υψηλότερη ενεργειακή τους κατάσταση με περιστροφή spin (κατάσταση βήτα) (Εικόνα 23).⁴⁷

Ωστόσο, όταν το σήμα ραδιοσυχνοτήτων απενεργοποιηθεί, μια μετρήσιμη ποσότητα σήματος ραδιοσυχνοτήτων δημιουργείται από τη χαλάρωση των περιστροφών, μέσω επιστροφής σε καταστάσεις χαμηλότερης ενέργειας (άλφα). Η φασματοσκοπία NMR βασίζεται σε αυτόν τον μηχανισμό

Η συχνότητα Larmor της περιστροφής ηλεκτρονίων βρίσκεται στην περιοχή μικροκυμάτων του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος και χρησιμοποιείται στον συντονισμό περιστροφής ηλεκτρονίων και η συχνότητα εξαρτάται από το γ . Γυρομαγνητικός λόγος, γ , είναι μια σταθερά για κάθε πυρήνα ($26,753 \text{ s}^{-1}\text{gauss}^{-1}$ για ^1H). Η ενεργειακή διαφορά ΔE είναι ανάλογη της ισχύς του μαγνητικού πεδίου B_0 και του γ .

$$\Delta E = \gamma \hbar \vec{B}_0 \quad (\text{E2})$$

$$E = h\nu \quad (\text{E3})$$

Από τις εξισώσεις E1 και E2 προκύπτει:

$$h\nu = \frac{\gamma \hbar \vec{B}_0}{2\pi} \Rightarrow \nu_{\text{NMR}} = \frac{\gamma \vec{B}_0}{2\pi} \quad \text{ή} \quad \nu_{\text{NMR}} = \frac{\omega}{2\pi} \quad (\text{E4})$$

όπου ω είναι η γωνιακή συχνότητα Larmor που δίνεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$\omega = \gamma \vec{B}_0 = \frac{q}{2m} \vec{B}_0 \quad (\text{E5})$$

όπου $\vec{B}_0$ είναι η ισχύς του μαγνητικού πεδίου και το ω είναι σε Hz.

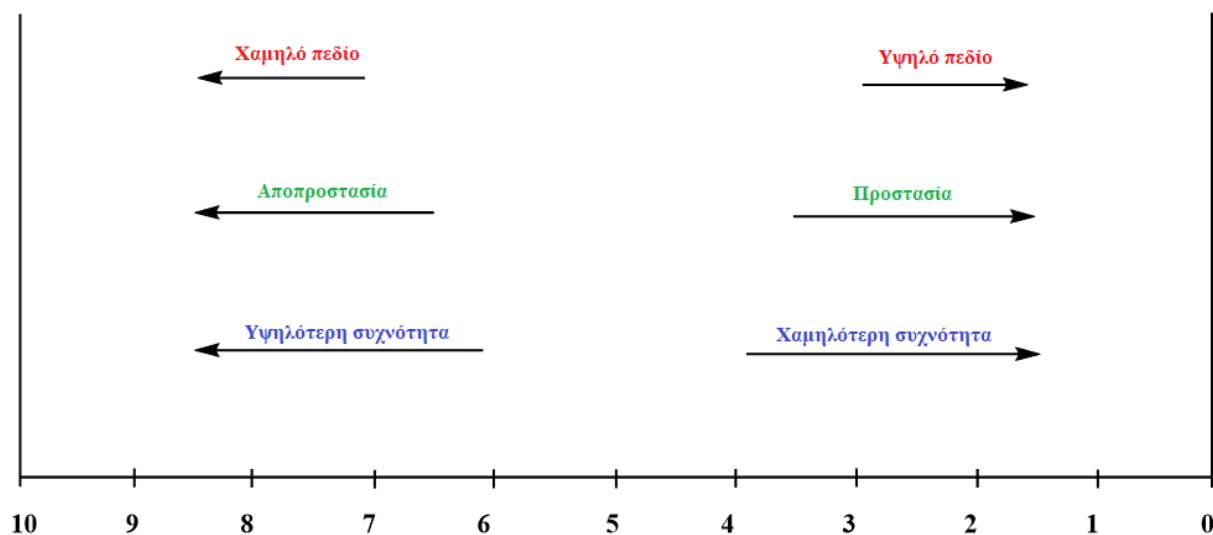
Το spin των ηλεκτρονίων ή των πρωτονίων θα επωφελούνταν στην κίνηση γύρω από το μαγνητικό πεδίο με μια συχνότητα που ονομάζεται συχνότητα Larmor. Στην κλίμακα ενός ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, οι ίδιοι οι πυρήνες εμφανίζουν μια εσωτερική συχνότητα σε megahertz, η οποία χαρακτηρίζεται ως συχνότητα Larmor. Όλα τα πρωτόνια σε ένα μόριο θα έχουν την ίδια συχνότητα Larmor. Ωστόσο, πρέπει να επισημανθεί ότι το σήμα και η χημική μετατόπιση προκαλούνται από το ηλεκτρονικό περιβάλλον ενός μεμονωμένου πρωτονίου.

Αν όλα τα πρωτόνια απορροφούσαν το ίδιο ποσό ενέργειας σε ένα δεδομένο μαγνητικό πεδίο, δεν θα μπορούσαμε να λάβουμε πολλές πληροφορίες. Όμως, τα πρωτόνια περιβάλλονται από ηλεκτρόνια που τα προστατεύουν απ' το εξωτερικό πεδίο. Τα περιστρεφόμενα ηλεκτρόνια δημιουργούν ένα επαγόμενο μαγνητικό πεδίο που είναι αντίθετο στο εξωτερικό μαγνητικό πεδίο. Ένα φάσμα NMR ορίζεται από το εφαρμοσμένο πεδίο ραδιοσυχνοτήτων έναντι απορρόφησης. Τα σήματα στο φάσμα σχετίζονται με το «συντονισμό». Η συχνότητα ενός σήματος εκφράζεται ως η χημική του μετατόπιση, που υποδηλώνεται με δ . Η χημική μετατόπιση με απόλυτο τρόπο καθορίζεται από τη συχνότητα του συντονισμού που φαίνεται από μια τυπική ένωση που περιγράφεται ότι είναι μηδέν ($\sigma=0$). Η κλίμακα κατασκευάζεται με διαχειρίσιμο τρόπο αποκαλύπτοντάς την σε μέρη ανά εκατομμύριο (ppm) και είναι ανεξάρτητη από τη συχνότητα του φασματομέτρου που χρησιμοποιείται. Η χημική μετατόπιση δίνεται από τον εξής τύπο:

$$\delta = \frac{\nu_s - \nu_R}{\nu_{RS}} \times 10^6 \quad (\text{E6})$$

όπου δ είναι η χημική μετατόπιση, το ν_s είναι η συχνότητα του σήματος, το ν_R είναι η συχνότητα της αναφοράς και το ν_{RS} είναι η συχνότητα του φασματομέτρου.

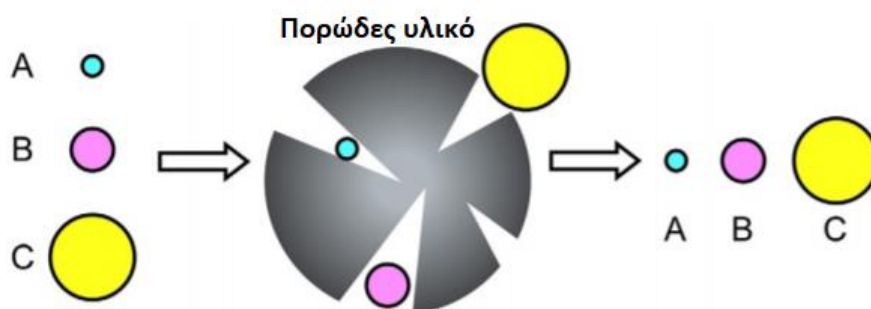
Το μέγεθος της μετατόπισης εξαρτάται από τον πυρήνα και τα χαρακτηριστικά της κίνησης ηλεκτρονίων στα κοντινά άτομα και μόρια. Η φασματοσκοπία NMR βοηθά στην εκτίμηση της χημικής μετατόπισης και, συνεπώς, στην κατανόηση των πληροφοριών σχετικά με τους χημικούς δεσμούς και τη δομή των μορίων. Ανάλογα με το ηλεκτρονικό περιβάλλον σε ένα άτομο τα πρωτόνια είναι προστατευμένα ή αποπροστατευμένα σε διαφορετικό ποσοστό. Τα προστατευμένα πρωτόνια εμφανίζουν απορρόφηση στη δεξιά πλευρά ή αλλιώς στο υψηλό πεδίο και τα αποπροσταυμένα στην αριστερή πλευρά του φάσματος ή αλλιώς στο χαμηλό πεδίο (Εικόνα 24).



Εικόνα 24: Συσχέτιση της χημικής μετατόπισης με την προστασία των πρωτονίων και το πεδίο.

4.1.2.2: Χρωματογραφία Διαχωρισμού μέσω Πηκτής (Gel Permeation Chromatography, GPC).

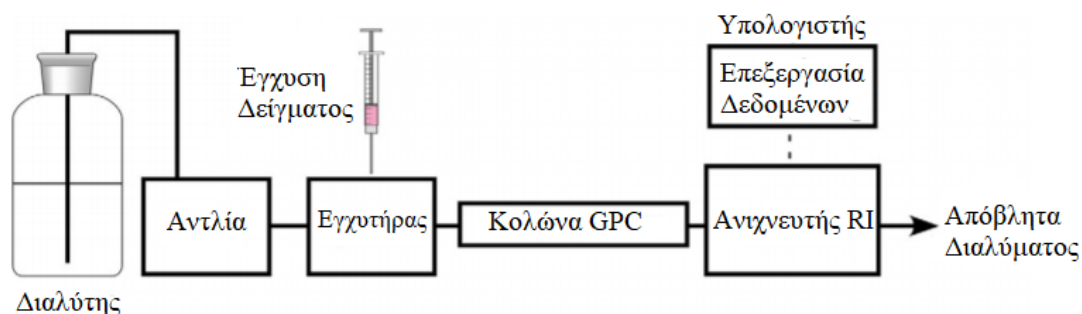
Η χρωματογραφία διαχωρισμού μέσω πηκτώματος (Gel Permeation Chromatography, GPC) είναι ένα είδος υγρής χρωματογραφίας και είναι μία από τις πιο χρήσιμες αναλυτικές μεθόδους που χρησιμοποιείται στη επιστήμη των πολυμερών και είναι επίσης γνωστή ως χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (Size Exclusion Chromatography, SEC),⁴⁸ διότι βασίζεται στον διαχωρισμό των μακρομοριακών αλυσίδων βάσει του μεγέθους τους (Εικόνα 25).⁴⁹



Εικόνα 25: Αναπαράσταση του διαχωρισμού πολυμερών διαφορετικού μεγέθους με GPC.⁴⁹

Με την μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται ο προσδιορισμός των μέσω μοριακών βαρών ενός πολυμερούς, η κατανομή του μοριακού βάρους ή αλλιώς η πολυδιασπορά του (PDI) που είναι υπεύθυνη για πολλές φυσικοχημικές ιδιότητες που χαρακτηρίζουν ένα πολυμερές, όπως ελαστική αντοχή, ευθραστότητα, σκληρότητα, ιξώδες κ.λ.π.

Το σύστημα GPC αποτελείται από μια αντλία, έναν εγχυτήρα για το δείγμα, μια στήλη GPC και έναν ανιχνευτή (Εικόνα 26). Η πειραματική διάταξη της τεχνικής GPC είναι η ίδια με τη συμβατική υγρή χρωματογραφία, με τη διαφορά ότι χρησιμοποιείται μια στήλη GPC. Συνήθως, ένας ανιχνευτής δείκτη διάθλασης (RI) ή ένας ανιχνευτής UV-ορατού χρησιμοποιείται ως ανιχνευτής στο GPC. Ωστόσο, αν και ο ανιχνευτής RI μπορεί να ανιχνεύσει τα περισσότερα πολυμερή, εμφανίζει χαμηλή ευαισθησία και χαμηλή σταθερότητα λόγω εξάρτησής του από τη θερμοκρασία. Στον ανιχνευτή RI, η διαφορά μεταξύ του μίγματος έκλουσης και του δείγματος σε διάλυμα είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση πολυμερούς, η οποία μπορεί έτσι να προσδιοριστεί με βάση την τιμή RI. Επιπλέον, ένας απαερωτήρας πρέπει να χρησιμοποιείται για την ανίχνευση RI, επειδή είναι ευαίσθητος στον αέρα στην έκλουση. Όταν ο RI του διαλύματος πολυμερούς είναι υψηλότερο από αυτό του διαλύτη έκλουσης, η ανιχνευόμενη κορυφή RI μπορεί να παρατηρηθεί ως θετικό σήμα. Αντίθετα, όταν το RI είναι χαμηλότερο από αυτό του διαλύτη έκλουσης, η κορυφή ανιχνεύεται ως αρνητικό σήμα. Εκτός αυτού, εάν ο RI του διαλύματος πολυμερούς είναι κοντά στο διαλύτη έκλουσης, δεν μπορεί να ανιχνευθεί κορυφή. Η ευαισθησία ανίχνευσης RI αυξάνεται όταν το RI του χρησιμοποιημένου διαλύτη διαφέρει σημαντικά από αυτό του διαλύματος πολυμερούς. Μια επιπλέον παράμετρος που επηρεάζει το RI είναι η αύξηση του έναντι της συγκέντρωσης (dn/dc). Έτσι, το dn/dc αντιπροσωπεύει μια διαφορική τιμή του RI (n) που εξαρτάται από τη συγκέντρωση (c). Επομένως, ένα έκλουσμα υψηλότερου dn/dc θα επέτρεπε πιο ευαίσθητη ανίχνευση, επειδή η ευαισθησία ανίχνευσης RI είναι ανάλογη με την



Εικόνα 26: Σχηματική απεικόνιση διάταξης του GPC συνδεδεμένο με ανιχνευτή RI.

dn/dc .

Το μοριακό βάρος των πολυμερών είναι ένας τρόπος να περιγράψουμε πόσο μακριές είναι οι πολυμερικές αλυσίδες. Για να χαρακτηρίσουμε τα μακρομοριακά συστήματα ως προς το μοριακό βάρος, πρέπει να αναφερθούμε στο μέσο μοριακό βάρος. Ο τύπος του μέσου μοριακού βάρους που λαμβάνεται εξαρτάται από την τεχνική μέτρησης που χρησιμοποιούμε. Ένα πολυμερές δεν έχει ένα μοναδικό μοριακό βάρος (M_w) αλλά μάλλον μια ποικιλία παραμέτρων μέσου μοριακού βάρους: μέσο μοριακό βάρος κατ' αριθμό (M_n), μέσο μοριακό βάρος κατά βάρος (M_w), μέσο μοριακό βάρος (M_z), υψηλότερο μέσο μοριακό βάρος (M_{z+1}).

Στο GPC, μπορεί να προσδιοριστεί ταυτόχρονα το μέσο μοριακό βάρος κατ' αριθμό (M_n), το μέσο μοριακό βάρος κατά βάρος (M_w) και το μέσο μοριακό βάρος (M_z). Επιπλέον, οι λόγοι M_w/M_n ή/και M_z/M_w χρησιμοποιούνται ως δείκτες για την αξιολόγηση της κατανομής μοριακού βάρους και είναι επίσης γνωστοί ως δείκτης πολυδιασποράς (PDI). Εάν αυτές οι αναλογίες είναι υψηλές, το πολυμερές εμφανίζει μεγάλη κατανομή μοριακού βάρους. Τα M_n , M_w και M_z μπορούν να οριστούν από τις ακόλουθες εξισώσεις:

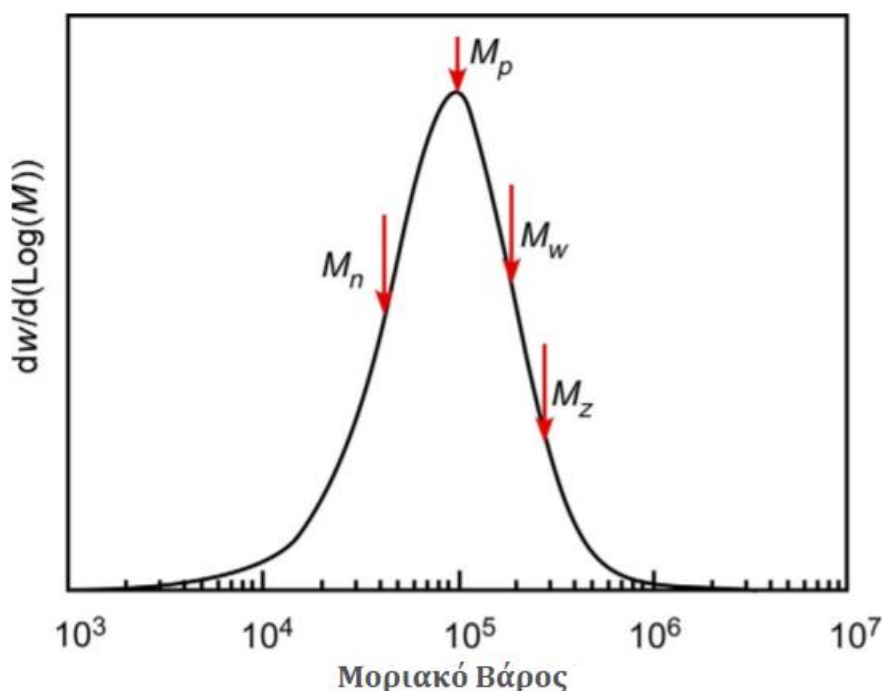
$$\overline{M}_n = \frac{\sum_{i=1}^x N_i M_i}{\sum_{i=1}^x N_i} \quad (E7)$$

$$\overline{M}_w = \frac{\sum_{i=1}^x N_i M_i^2}{\sum_{i=1}^x N_i M_i} \quad (E8)$$

$$\overline{M}_z = \frac{\sum_{i=1}^x N_i M_i^3}{\sum_{i=1}^x N_i M_i^2} \quad (E9)$$

όπου N_i είναι ο αριθμός των μορίων του πολυμερούς και το M_i είναι το μοριακό βάρος.

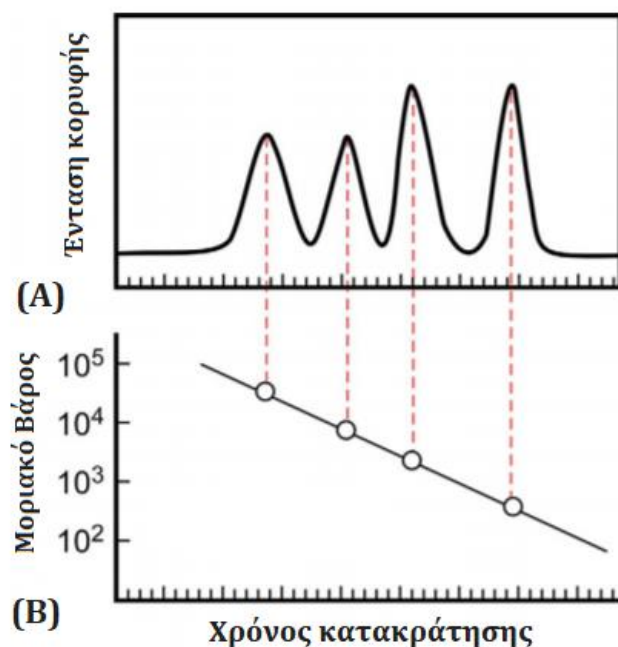
Σύμφωνα με την εξίσωση (E7), το M_n είναι ένας απλός αριθμητικός μέσος όρος, ο οποίος είναι ευαίσθητος στην παρουσία συστατικών χαμηλού μοριακού βάρους. Το M_w είναι το μέσο μοριακό βάρος κατά βάρος και είναι ευαίσθητο στην παρουσία πολυμερικών αλυσίδων υψηλού μοριακού βάρους. Το M_z είναι επίσης ένας σταθμισμένος μέσος όρος χρησιμοποιώντας το τετράγωνο του μοριακού βάρους και είναι πιο ευαίσθητο στην παρουσία πολυμερικών αλυσίδων υψηλού μοριακού βάρους από το M_w . Γενικά, η σχέση μεταξύ αυτών των παραγόντων είναι $M_n \leq M_w \leq M_z$ (Εικόνα 27). Στην περίπτωση ενός πολυμερούς μονοδιασποράς χωρίς κατανομή μοριακού βάρους, η σχέση τους είναι $M_n = M_w = M_z$.⁵⁰



Εικόνα 27: Η καμπύλη GPC και η σχέση μεταξύ των μέσων M_n , M_w και M_z . Το M_p δείχνει την κορυφή της καμπύλης GPC.⁴⁹

Τέλος, είναι απαραίτητο πριν την μέτρηση να γίνει βαθμονόμηση του μηχανήματος με πρότυπα διαλύματα πολυμερών με γνωστό μοριακό βάρος, στενή κατανομή

μοριακού βάρους, και ίδια ή παρόμοια χημική δομή με το δείγμα του πολυμερούς υπό μελέτη, επειδή η καμπύλη βαθμονόμησης διαφέρει για κάθε τύπο πολυμερούς. Κάποια από τα πιο γνωστά πολυμερή που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι το πολυστυρένιο (PS), πολύ-(μεθακρυλικός μεθυλεστέρας) ή PMMA, πολυ-(οξείδιο αιθυλενίου) (PEO) και πολυ-(σουλφονικό στυρένιο) νατρίου (PSSNa). Αυτά τα πρότυπα πολυμερή με διαφορετικά μοριακά βάρη διατίθενται στο εμπόριο και η κατανομή μοριακού βάρους και μοριακού βάρους τους είναι προκαθορισμένη. Το μοριακό βάρος που λαμβάνεται από το GPC για ένα δείγμα πολυμερούς είναι το



Εικόνα 28: (Α) Καμπύλη έκλουσης GPC για πρότυπο δείγμα με τέσσερα διαφορετικά μοριακά βάρη και (Β) καμπύλη βαθμονόμησης για το πρότυπο δείγμα.⁴⁹

σχετικό μοριακό βάρος, υποθέτοντας ότι έχει την ίδια χημική δομή με το πρότυπο πολυμερές. Επομένως, εάν η μοριακή δομή του πρότυπου πολυμερούς είναι σημαντικά διαφορετική από εκείνη του δείγματος πολυμερούς, η απόκλιση από το πραγματικό μοριακό βάρος μπορεί να αυξηθεί σημαντικά.⁵¹

4.2.:Σύνθεση Νανοσωματιδίων Συζυγιακών Πολυμερών (Conjugated Polymer Nanoparticles, CPNPs ή CPNs)

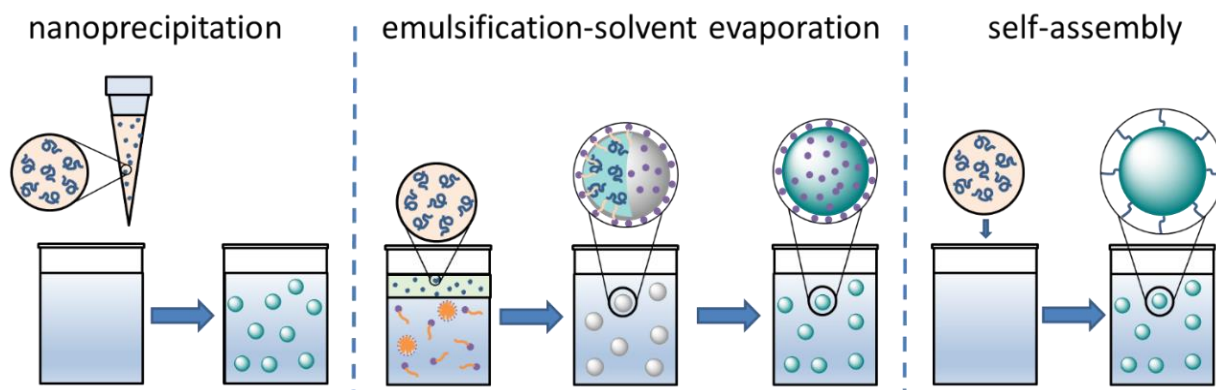
Τα συζυγιακά πολυμερή από την φύση τους είναι καλύτερα διαλυτά σε μη πολικούς διαλύτες, αφού είναι υδρόφοβα μακρομόρια. Κατά συνέπεια, υπάρχει δυσκολία στην διάλυσή τους στο νερό και επομένως στην εισαγωγή τους στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου. Παρ' όλα αυτά, έχουν δημιουργηθεί τρόποι για να διαλύονται, όπως με εξαναγκασμό ή καταβύθιση (nanoprecipitation) ή εγκλεισμό (encapsulation) στο νερό και σε συνέχεια να μελετώνται σε καρκινικά κύτταρα.

Σύμφωνα με την ομάδα της Δρ. Γουάνγκ,²⁰ για να ανταποκριθούν στις απαιτήσεις της βιοϊατρικής έρευνας και της εφαρμογής, σχεδιάζονται και συντίθενται όλο και περισσότερο τα CPNPs με μεγάλη απορρόφηση μήκους κύματος (NIR περιοχή) εξαιτίας της βαθιάς διεύδυσης των ιστών και της χαμηλής φωτοτοξικότητας στα βιολογικά συστήματα. Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα συζυγιακά πολυμερή με φαινόμενο Δότη-Δέκτη (Donor-Acceptor, D-A), τα οποία συντίθενται με

πολυμερισμό Suzuki ή Stille και έχει γίνει μια τάση να αξιοποιηθεί η στρατηγική μεταφοράς ενδομοριακού φορτίου για να μειωθεί το εύρος ζώνης των πολυμερών για να ληφθεί η απορρόφηση με κόκκινη μετατόπιση. Επομένως, οι τύποι των CPs αναπτύσσονται από πολυθειοφαίνιο (PT), πολυφλουορένιο (PF), πολυφαινυλενοαιθυλένιο (PPE) και πολυ-π-φαινυλενοβινυλένιο και διάφορα άλλα συμπολυμερή. Οι συνήθειες μέθοδοι σύνθεσης CPNPs περιλαμβάνουν το εξαναγκασμό και εγκλωβισμό, που αναφέρθηκαν παραπάνω, καθώς και η δημιουργία μικρογαλακτώματος (miniemulsion) και αυτό-οργάνωση (self-assembly) και φαίνονται σχηματικά στην Εικόνα 30. Οι πρώτες δύο χρησιμοποιούνται μέχρι στιγμής περισσότερο.

Στη μέθοδο της νανοκαταβύθισης, τα CPs διαλύονται σε ένα οργανικό διαλύτη (αναμίξιμο με νερό, γενικά τετραϋδροφουράνιο), και κατόπιν το οργανικό διάλυμα προστίθεται στάγδην σε δισαπεσταγμένο νερό υπό υπερήχους. Η μέθοδος του εγκλωβισμού είναι η ίδια διαδικασία με την νανοκαταβύθιση με την διαφορά ότι μαζί με τα CPs προστίθεται και ένα αμφίφιλο στον οργανικό διαλύτη. Για να ληφθούν CPNs στο νερό, ο οργανικός διαλύτης στη συνέχεια απομακρύνεται με εξάτμιση.

Για τη μέθοδο δημιουργίας μικρογαλακτώματος τα CPs διαλύονται σε διχλωρομεθάνιο και στη συνέχεια αναμειγνύονται με τασιενεργές ουσίες για να σχηματίσουν γαλάκτωμα υπό υπερήχους. Αφού απομακρυνθεί ο οργανικός διαλύτης, λαμβάνεται το μέγεθος και η διασπορά των CPNs. Για τη μέθοδο αυτόματης συναρμολόγησης, τα CPs πρέπει να φέρουν αντίθετα φορτισμένα φορτία ή τα CPs να είναι σχεδιασμένα για να είναι αμφίφιλα.



Εικόνα 30: Σχηματικό διάγραμμα παρασκευής νανοσωματιδίων συζυγιακού πολυμερούς

4.2.1.:Χαρακτηρισμός Νανοσωματιδίων Συζυγιακών Πολυμερών

Ο χαρακτηρισμός των CPNs είναι εξίσου κρίσιμος αφού παρουσιάζουν διαφορετικές ιδιότητες σε αυτή τη μορφή και ως υλικά. Πιο αναλυτικά, πρέπει να γίνεται γνωστό το μέγεθος τους, το δυναμικό ζ έτσι ώστε να κρίνεται αν είναι κατάλληλο για χρήση σε μετέπειτα πειράματα. Αυτά διαπιστώνονται με μέτρηση με Δυναμική Σκέδαση Φωτός (Density Light Scattering, DLS) και δυναμικό zeta (zeta potential) σε μηχάνημα που κάνει και τις δύο τεχνικές και ονομάζεται συνήθως Zetasizer. Επιπρόσθετα και η μέθοδος της Μικροσκοπίας Ατομικής Δύναμης (Atomic Force Microscopy, AFM) θα μπορούσε να δώσει κάποιες ακόμα πληροφορίες για τον χαρακτηρισμό των νανοσωματιδίων. Επίσης, πρέπει να γίνεται μελέτη των φασμάτων UV-Vis και

φθορισμού (αν υπάρχει) για να αποφανθεί και σε ποιες εφαρμογές βιοαπεικόνισης ή θεραπειάς είναι καταλληλότερες για να εφαρμοστούν.

4.2.1.2.: Δυναμική Σκέδαση Φωτός (Density Light Scattering, DLS)

Η τεχνική της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός ή DLS είναι ευρύτερα γνωστή, ιδιαίτερα στον τομέα της Νανοτεχνολογίας, αφού μπορεί να μετρήσει το μέγεθος σωματιδίων και σε κλίμακα νανομέτρων. Αυτό συμβαίνει επειδή ουσιαστικά η δυναμική σκέδαση φωτός είναι μια τεχνική που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό του προφίλ κατανομής μεγέθους μικρών σωματιδίων σε εναιώρημα ή πολυμερών σε διάλυμα και βασίζεται στην κίνηση Brown των διασπαρμένων σωματιδίων.⁵²

Όταν τα σωματίδια διασκορπίζονται σε ένα υγρό κινούνται τυχαία προς όλες τις κατευθύνσεις. Η αρχή της κίνησης Brown εκφράζει ότι τα σωματίδια συγκρούονται συνεχώς με μόρια διαλύτη. Εξαιτίας των συγκρούσεων τα μόρια του πολυμερούς εκτελούν μεταφορική, αλλά και περιστροφική κίνηση. Αυτές οι συγκρούσεις προκαλούν μεταφορά ορισμένης ποσότητας ενέργειας, η οποία προκαλεί την κίνηση των σωματιδίων. Η μεταφορά ενέργειας είναι περισσότερο ή λιγότερο σταθερή και επομένως έχει μεγαλύτερη επίδραση σε μικρότερα σωματίδια. Ως αποτέλεσμα, τα μικρότερα σωματίδια κινούνται σε υψηλότερες ταχύτητες από τα μεγαλύτερα σωματίδια.⁵³

Η πιθανότητα $P(x,t)$ να βρεθεί ένα μόριο στη θέση x στη χρονική στιγμή t , υποθέτοντας ότι βρισκόταν στην αρχή των αξόνων τη χρονική στιγμή $t=0$ δίνεται από την εξής σχέση:

$$\frac{\partial P(x,t)}{\partial t} = \frac{D_t \partial^2 P(x,t)}{\partial x^2} \quad (\text{E10})$$

όπου D_t είναι ο συντελεστής διάχυσης μεταφορικής κίνησης του μορίου. Αντίστοιχα αν ένα μόριο κυλινδρικού σχήματος υπόκειται σε κίνηση Brown η πιθανότητα να βρεθεί στις σφαιρικές συντεταγμένες ϑ, φ στο χρόνο t είναι $P(\vartheta\varphi/\vartheta_0\varphi_0, t)$ με ϑ_0, φ_0 τις συντεταγμένες σε $t=0$ και δίνεται από τη σχέση:

$$\frac{\partial P}{\partial t} = \left(\frac{\Omega \partial \sin \theta}{\sin^2 \theta} \right) \times \left[\left(\frac{\partial}{\partial \theta} \right)^2 + \left(\frac{\partial^2}{\partial \varphi^2} \right) \right] \times P \quad (\text{E11})$$

με Ω το συντελεστή διάχυσης περιστροφικής κίνησης. Από τις παραπάνω σχέσεις φαίνεται ότι οι συντελεστές διάχυσης των μακρομορίων συνδέονται άμεσα με την κίνησή τους.

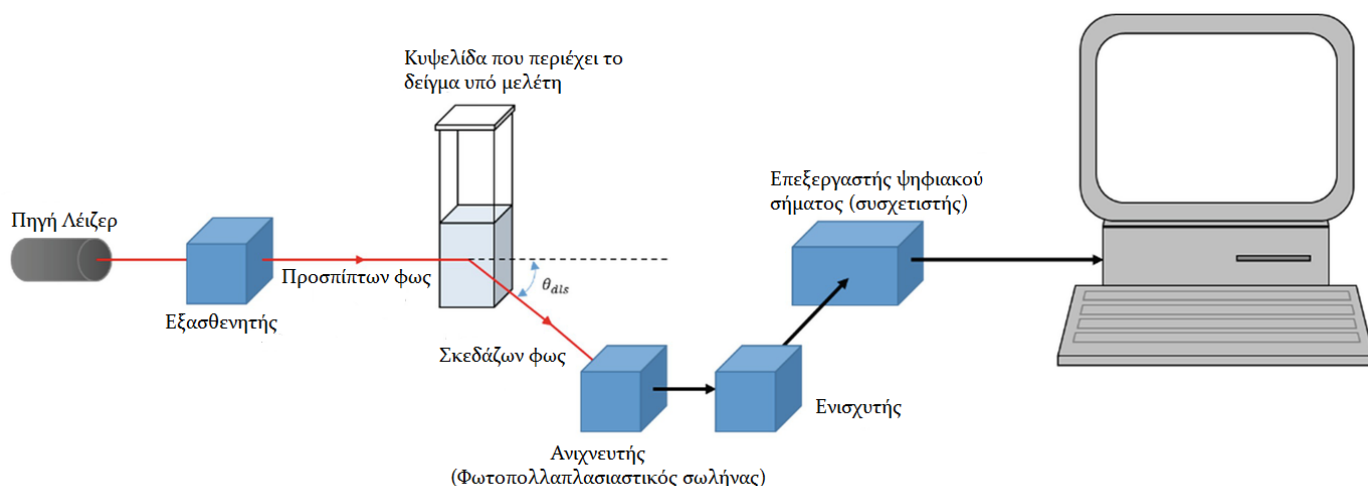
Όταν μονοχρωματική ακτινοβολία στο ορατό φάσμα προσπίπτει σε ένα διαυγές υγρό το φως σκεδάζεται, λόγω διακυμάνσεων πυκνότητας. Στην περίπτωση διαλυμάτων η σκέδαση φωτός οφείλεται κυρίως σε διακυμάνσεις συγκέντρωσης. Οι διακυμάνσεις αυτές συνδέονται με την κίνηση Brown. Αν δεν υπάρχει αλλαγή συχνότητας της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας σε σχέση με αυτή της προσπίπτουσας, η σκέδαση ονομάζεται ελαστική. Αν οι διακυμάνσεις (πυκνότητας και συγκέντρωσης) δεν αλλάζουν πολύ με το χρόνο ή εάν η ένταση σκεδάσεως μετράται για μία χρονική περίοδο που είναι μεγάλη σε σχέση με το χρόνο μεταβολής των διακυμάνσεων, δεν παρατηρείται αλλαγή στη συχνότητα του σκεδαζόμενου φωτός. Παρόλα αυτά οι διακυμάνσεις σε διαλύματα εξαρτώνται από το χρόνο εξαιτίας της κίνησης Brown.

Έτσι η συχνότητα του σκεδαζόμενου φωτός θα έχει ένα φάσμα χαρακτηριστικό της χρονικής εξάρτησης των διακυμάνσεων και της κίνησης των μακρομορίων (φαινόμενο Doppler).

Η σχέση μεταξύ της ταχύτητας των σωματιδίων και του μεγέθους των σωματιδίων δίνεται από την εξίσωση Stokes-Einstein Γνωρίζουμε ότι η εξίσωση Stokes-Einstein είναι η εξής:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H} \quad (\text{E12})$$

όπου D ο συντελεστής διάχυσης, k_B η σταθερά Boltzmann, T απόλυτη θερμοκρασία, η το ιξώδες του ρευστού και R_H η υδροδυναμική ακτίνα.



Εικόνα 31: Σχηματική Απεικόνιση πειραματικής διάταξης ενός οργάνου DLS.

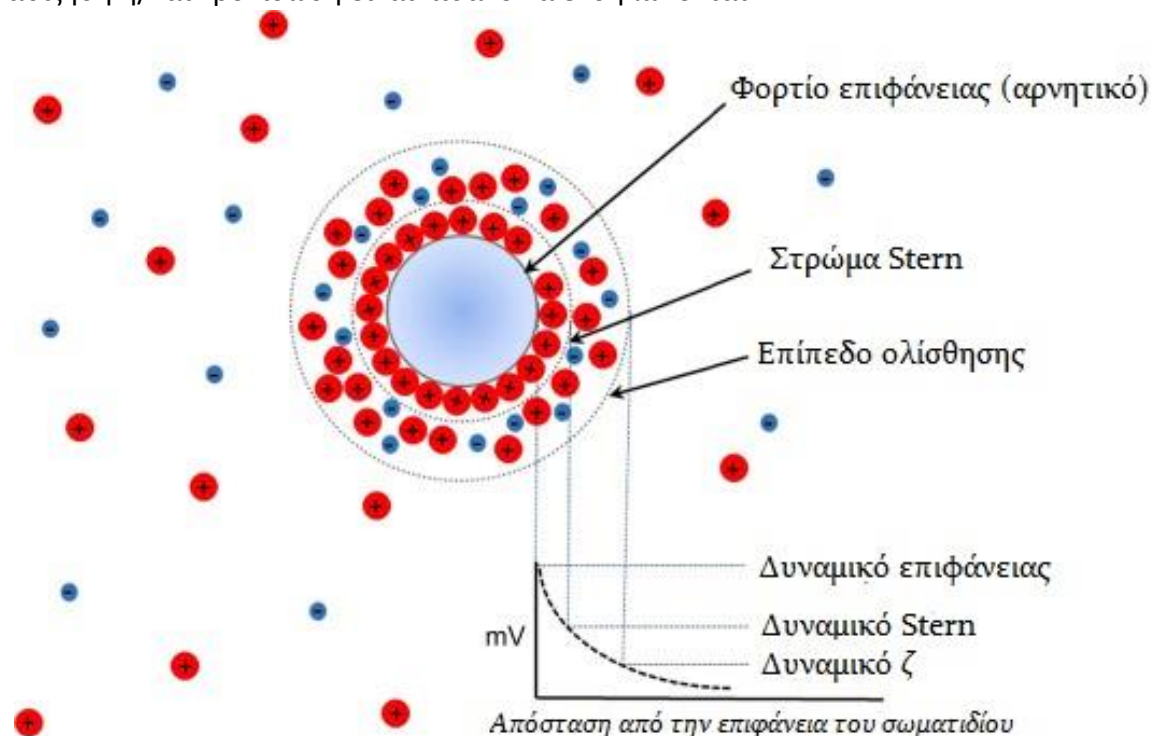
4.2.1.3.: Δυναμικό zeta, ζ (zeta potential)

Η τεχνική μέτρησης του δυναμικού ζ έχει αποκτήσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον και αποτελεί χρήσιμο εργαλείο για τον χαρακτηρισμό των νανοσωματιδίων ως προς την σταθερότητά τους, την επιφανειακή λειτουργικότητα που εμφανίζουν καθώς και την αλληλεπίδραση διαλυμένων ενώσεων με τη στερεή επιφάνεια. Οι μονάδα μέτρησης του είναι συνήθως σε mV (millivolts) ή ακόμα και σε Volts. Το δυναμικό ζ ή αλλιώς ηλεκτροκινητικό δυναμικό δημιουργείται στην επιφάνεια οποιουδήποτε υλικού όταν έρχεται σε επαφή με υγρό μέσο. Δηλαδή είναι το φορτίο που αναπτύσσεται στη διεπιφάνεια μεταξύ ενός στερεού και του υγρού μέσου στο οποίο βρίσκεται.

Αναλυτικότερα, εάν ένα υλικό έρθει σε επαφή με ένα υγρό μέσο, οι λειτουργικές ομάδες στην επιφάνειά του υλικού θα αντιδράσουν με το περιβάλλον μέσο. Αυτή η διαδικασία οδηγεί σε επιφανειακή φόρτιση, η οποία προκαλεί τη συσσώρευση αντίθετα φορτισμένων ιόντων. Αυτά τα ιόντα τοποθετούνται με αυθόρμητο τρόπο σε ένα λεγόμενο διπλό ηλεκτροχημικό στρώμα. Το δυναμικό ζ ορίζεται ως το άθροισμα του αρχικού επιφανειακού φορτίου και του συσσωρευμένου στρώματος (Εικόνα 32).⁵⁴

Το δυναμικό ζ των σωματιδίων είναι ένας βασικός δείκτης της σταθερότητας μιας κolloειδούς διασποράς, όπως τα νανοσωματίδια ή τα λιποσώματα, καθώς αντανakλά στην ικανότητα των σωματιδίων να απωθούνται μεταξύ τους ηλεκτροστατικά. Εμπειρικά, θεωρείται ότι οι απόλυτες τιμές δυναμικού zeta

υψηλότερες από $\pm 30\text{mV}$ αποτελούν ένδειξη σταθερών διασπορών. Το μέγεθος του δυναμικού ζ δείχνει τη σταθερότητα του δείγματος, ενώ το θετικό ή αρνητικό πρόσημο του δυναμικού ζ δείχνει εάν τα θετικά ή αρνητικά φορτία κυριαρχούν στην επιφάνεια. Κάτω από την τιμή $\pm 30\text{mV}$, κάποιες διεργασίες όπως συσσωμάτωση, καθίζηση ή/και κροκίδωση είναι πιθανό να εκδηλώνονται.



Εικόνα 32: Σκίτσο απεικόνισης του ορισμού του δυναμικού ζ .⁵⁴

Η μέτρηση του δυναμικού ζ γίνεται σε μία κυψελίδα το διάλυμα υπό μελέτη και ένα κούμπωμα, το οποίο περιέχει δύο χρυσά ηλεκτρόδια που έρχονται σε επαφή με το διάλυμα. Όταν εφαρμόζεται τάση στο ηλεκτρόδιο, τα σωματίδια θα κινηθούν προς το ηλεκτρόδιο με το αντίθετο φορτίο. Μια τεχνική Doppler χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της ταχύτητας των σωματιδίων ως συνάρτηση της τάσης. Από την πηγή λέιζερ, η δέσμη του λέιζερ περνά μέσα από την κυψελίδα, και καθώς τα σωματίδια κινούνται μέσω της δέσμης αυτής, η ένταση του διασκορπισμένου φωτός κυμαίνεται σε συχνότητα ανάλογη με την ταχύτητα των σωματιδίων. Η ταχύτητα σωματιδίων σε πολλαπλές τάσεις μετράτε και αυτά τα δεδομένα χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό του δυναμικού ζ .

Οι θεμελιώδεις εξισώσεις που συσχετίζουν το δυναμικό ροής και το ρεύμα ροής με το δυναμικό ζ έχουν προκύψει από τους Hermann von Helmholtz και Marjan von Smoluchowski.

Το δυναμικό ζ υπολογίζεται από ηλεκτροφορητική κινητικότητα μ_e ($\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$), η οποία μπορεί να μετρηθεί άμεσα. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα μπορεί να υπολογιστεί από την εξής σχέση:

$$\mu_e = \frac{V}{E} \quad (\text{E13})$$

όπου V είναι η ταχύτητα των σωματιδίων (σε μms^{-1}) και E το ηλεκτρικό πεδίο (σε Vcm^{-1}). Το δυναμικό ζ μπορεί να υπολογιστεί από μ_e μέσω της εξίσωσης Henry:

$$\mu_e = \frac{2\varepsilon_r \varepsilon_0 \zeta f(\kappa a)}{3\nu} \quad (\text{E14})$$

όπου ε_r είναι η σχετική διαπερατότητα, ε_0 η διαπερατότητα του κενού, ζ το δυναμικό zeta, $f(\kappa a)$ η συνάρτηση του Henry και ν το ιξώδες του υγρού μέσου στην θερμοκρασία κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Η συνάρτηση Henry $f(\kappa a)$ για $\kappa a \rightarrow \infty$ τότε έχουμε $f(\kappa a) \rightarrow 1$ (τύπος Smoluchowski) και αν $\kappa a \rightarrow 0$ τότε έχουμε $f(\kappa a) \rightarrow \infty$ (τύπος Hückel). Για τα σωματίδια που είναι διασκορπισμένα σε νερό (πολικό μέσο) η προσέγγιση Smoluchowski χρησιμοποιείται η τιμή $f(\kappa a) = 1,5$. Αυτή η προσέγγιση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για σωματίδια όταν το πάχος του ηλεκτρικού διπλού στρώματος είναι πολύ μικρότερο από τη διάμετρο των σωματιδίων. Για αυτήν την περίπτωση, η εξίσωση του Henry ανάγεται στην εξίσωση Helmholtz – Smoluchowski:

$$\mu_e = \frac{\varepsilon_r \varepsilon_0 \zeta}{\nu} \quad (\text{E15})$$

Μετρήσεις ζ δυναμικού μπορούν γενικά να πραγματοποιηθούν και σε πιο πολύπλοκα μόρια, όπως πρωτεΐνες BSA, HSA καθώς και για βιολογικά υλικά κ.α.

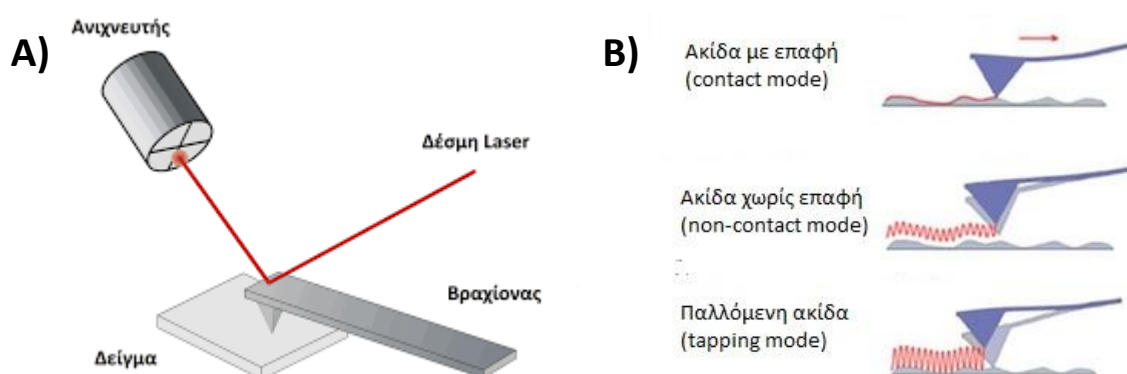
4.2.1.4.: Μικροσκοπία Ατομικής Δύναμης (Atomic Force Microscopy, AFM)

Η μικροσκοπία AFM μετρά την ατομική δύναμη μεταξύ ενός άκρου και μιας επιφάνειας και δίνει εικόνες των ατόμων που βρίσκονται πάνω σε μια επιφάνεια ή μέσα σ' αυτήν. Σε ένα μικροσκόπιο AFM, η συνολική δύναμη αποτελείται από συνεισφορές αλληλεπιδράσεων μεγάλης και μικρής εμβέλειας που μπορεί να είναι μη μονοτονικές.⁵⁵ Αυτό καθιστά το σήμα ανατροφοδότησης λιγότερο ανιχνεύσιμο. Το AFM έχει τρεις μεγάλες ικανότητες: μέτρηση δύναμης, τοπογραφική απεικόνιση και χειραγώγηση.

Στη μέτρηση δύναμης, τα AFM μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μέτρηση των δυνάμεων μεταξύ του ανιχνευτή και του δείγματος ως συνάρτηση του αμοιβαίου διαχωρισμού τους. Αυτό μπορεί να εφαρμοστεί για την εκτέλεση φασματοσκοπίας δύναμης, για τη μέτρηση των μηχανικών ιδιοτήτων του δείγματος, όπως ο συντελεστής Young του δείγματος, ένα μέτρο δυσκαμψίας. Για απεικόνιση, η αντίδραση του ανιχνευτή στις δυνάμεις που το δείγμα επιβάλλει μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να σχηματίσει μια εικόνα του τρισδιάστατου σχήματος (τοπογραφία) μιας επιφάνειας δείγματος σε υψηλή ανάλυση. Αυτό επιτυγχάνεται με σάρωση της θέσης του δείγματος σε σχέση με το άκρο και καταγραφή του ύψους του ανιχνευτή που αντιστοιχεί σε μια σταθερή αλληλεπίδραση δείγματος ανιχνευτή. Η τοπογραφία επιφανείας εμφανίζεται συνήθως ως ψευδοκόλληση. Ταυτόχρονα με την απόκτηση τοπογραφικών εικόνων, άλλες ιδιότητες του δείγματος μπορούν να μετρηθούν τοπικά και να εμφανιστούν ως εικόνα, συχνά με παρόμοια υψηλή ανάλυση. Κατά την χειραγώγηση, οι δυνάμεις μεταξύ του άκρου και του δείγματος μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για την αλλαγή των ιδιοτήτων του δείγματος με ελεγχόμενο τρόπο. Παραδείγματα αυτού περιλαμβάνουν ατομικό χειρισμό, λιθογραφία ανιχνευτή σάρωσης και τοπική διέγερση κυττάρων.⁵⁶

Η λειτουργία του οργάνου για την λήψη εικόνων, αποτελείται από τρεις μεθόδους⁵⁷:

- **Ημιστατικής Επαφής (Contact Mode)**, όπου η αιχμή της ακίδας βρίσκεται τοποθετημένη σε λιγότερα από μερικά Angstrom (10-10m) από την επιφάνεια του δείγματος. Οι δυνάμεις που αναπτύσσονται είναι απωστικές. Οι μοχλοβραχίονες που χρησιμοποιούνται είναι εύκαμπτοι, λόγω της συνεχούς επαφής τους με το δείγμα και παρέχουν υψηλή ευαισθησία, αποφεύγοντας υπερβολικές επιδράσεις της ακίδας στην επιφάνεια του δείγματος.
- **Ταλαντούμενης Επαφής (non-Contact Mode)**, ο μοχλοβραχίονας είναι δύσκαμπτος και πραγματοποιεί εξαναγκασμένη ταλάντωση, λόγω των ελκτικών δυνάμεων που αναπτύσσονται. Η ακίδα βρίσκεται κοντά στο δείγμα, αλλά δεν έρχεται σε επαφή. Οι δυνάμεις που αναπτύσσονται είναι της τάξεως των pN (10-12N) και παρατηρούνται οι αλλαγές στο εύρος ή στην συχνότητα, με την οποία ταλαντώνεται ο μοχλοβραχίονας. Στη μέθοδο αυτή απαιτείται μεγάλη ακρίβεια και σταθερότητα του συστήματος.
- **Διακοπτόμενης Επαφής (Tapping Mode)** και σ' αυτήν την περίπτωση ο μοχλοβραχίονας είναι δύσκαμπτος. Η εξαναγκασμένη ταλάντωση διεγείρεται κοντά ή ακριβώς στη συχνότητα συντονισμού του και έχει πλάτος 10-100 nm. Το μεγαλύτερο εύρος ταλάντωσης πραγματοποιείται στην περιοχή, όπου η δύναμη είναι απωστική και η ακίδα αγγίζει διακοπτόμενα το δείγμα. Η μέθοδος αυτή, είναι κατάλληλη για μαλακά δείγματα.⁵⁸



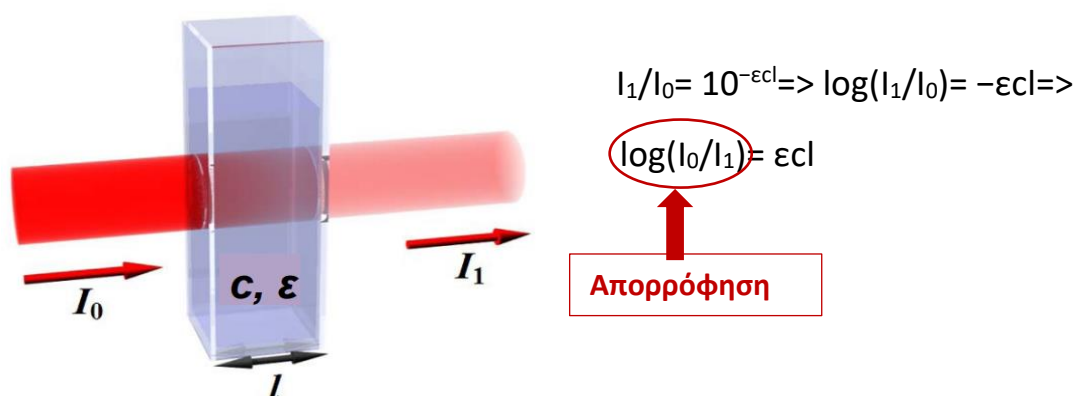
Εικόνα 33: Α) Σχηματική απεικόνιση λειτουργίας ενός μικροσκοπίου AFM και Β) Σχηματική απεικόνιση 3 διαφορετικών λειτουργιών ακίδας.⁵⁷

4.3.: Φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού UV-Vis

Είναι απαραίτητο να γίνεται πάντα, η φωτοφυσική μελέτη μιας ένωσης, πολυμερούς ή νανοσωματιδίων και πιο συγκεκριμένα αυτό γίνεται μέσω της καταγραφής των φασμάτων απορρόφησης υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) και των φασμάτων εκπομπής (φθορισμού, φωσφορισμού), ώστε να επιλεγεί το μήκος κύματος της ακτινοβολίας έτσι ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή διέγερση σε κάποια πιθανή εφαρμογή τους.

Η απορρόφηση φωτονίων μέσω φωτός περιγράφεται από τον νόμο Lambert-Beer, μια σχέση που υποδηλώνει μείωση της έντασης καθώς η δέσμη διέρχεται από ένα μέσο που μπορεί να το απορροφήσει. Δηλαδή αν σε μία κυψελίδα με μήκος l , με διάλυμα ορισμένης συγκέντρωσης c , απορροφάται φως με ένταση του φωτός που εισέρχεται στην ουσία, I_0 , να είναι μεγαλύτερο από την ένταση του αναδύμενου φωτός, I_1 και έτσι υπάρχει μια εκθετική σχέση μεταξύ της σχετικής απορρόφησης (I_1/I_0)

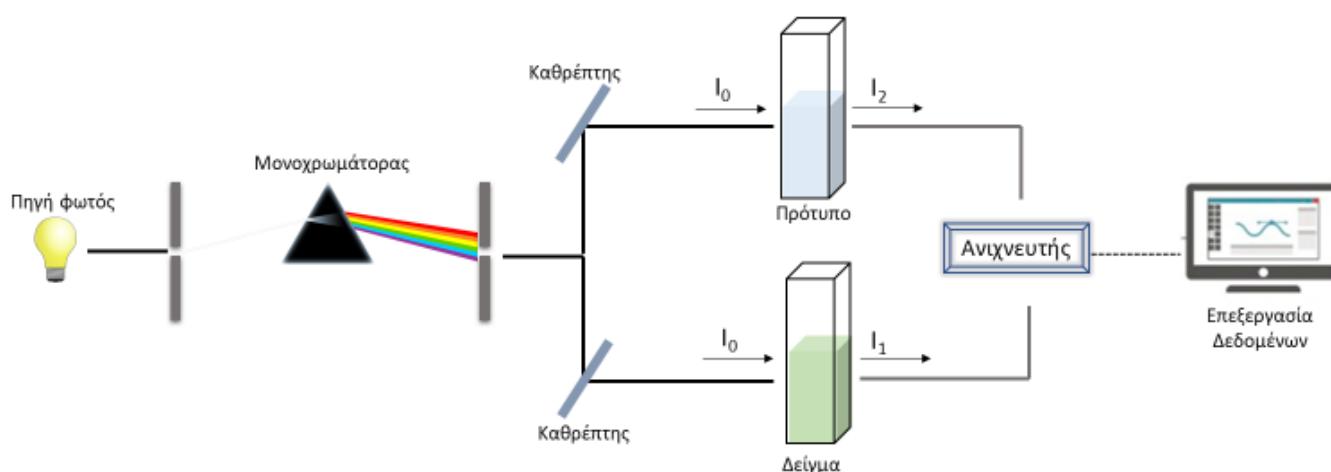
I_0) και της συγκέντρωσης και το μήκος διαδρομής (l) της απορροφητικής ουσίας (Εικόνα 34).



Εικόνα 34: Απεικόνιση απορρόφησης φωτός σε μία ουσία τοποθετημένη σε μία κυψελίδα μήκους l .

Συνεπώς προκύπτει ότι **$A = \epsilon c l$** και αποτελεί τη σχέση Lambert-Beer, όπου ϵ ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης που είναι χαρακτηριστικός για κάθε ουσία σε δεδομένο μήκος κύματος, c η συγκέντρωση του διαλύματος και l η απόσταση που διανύει το φως-μήκος κυψελίδας.

Για μια δεδομένη ουσία, ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης ϵ ποικίλλει ανάλογα με το μήκος κύματος του χρησιμοποιούμενου φωτός. Μια γραφική παράσταση του ϵ (ή $\log \epsilon$) έναντι του μήκους κύματος (ή του κυματαρίθμου) ονομάζεται φάσμα απορρόφησης της ουσίας. Η κύρια χρήση των φασμάτων απορρόφησης από την φωτοχημική πλευρά είναι ότι παρέχουν πληροφορίες ως προς ποιο είναι το μέγιστο μήκος κύματος ($\lambda_{\max}$) σε μια ένωση και ο αντίστοιχα μέγιστος συντελεστής μοριακής απορρόφησης ($\epsilon_{\max}$). Έτσι, γίνεται γνωστό ποιο $\lambda_{\max}$ επιτρέπει τη βέλτιστη φωτοδραστικότητα μίας ένωσης για να γίνει η ακτινοβολή της



Εικόνα 35: Σχηματική απεικόνιση ενός φασματοφωτόμετρου UV-Vis.

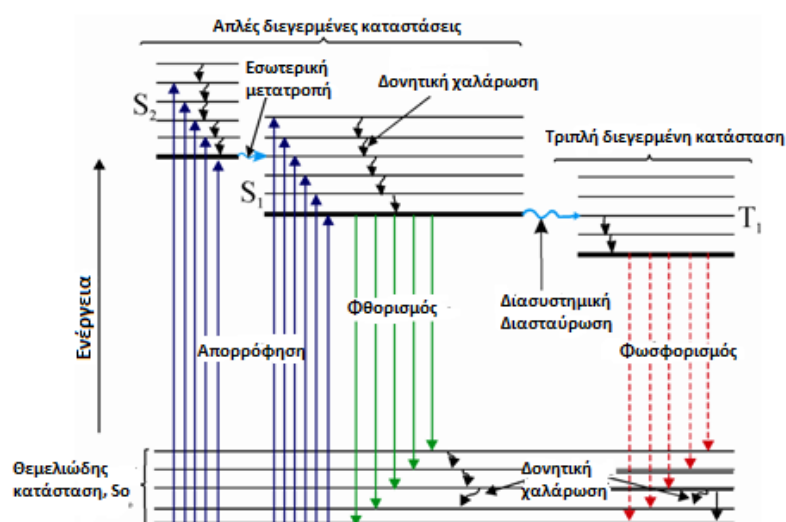
Ένα φασματοφωτόμετρο UV-Vis (Εικόνα 35) περιέχει μια πηγή φωτός, ένα περίβλημα περίθλασης σε ένα μονοχρωμάτορα ή ένα πρίσμα για να διαχωριστούν τα διαφορετικά μήκη κύματος του φωτός και ένας ανιχνευτής. Η πηγή ακτινοβολίας είναι συχνά ένα νήμα βολφραμίου (300-2500nm), μία λάμπα δευτερίου, η οποία είναι συνεχής πάνω από την υπεριώδη περιοχή (190-400nm), λυχνία ξένου, η οποία

είναι συνεχώς από 160 έως 2000nm. ή πιο πρόσφατα, δίοδοι εκπομπής φωτός (LED) για τα ορατά μήκη κύματος. Ο ανιχνευτής είναι συνήθως ένας φωτοπολλαπλασιαστής, μια φωτοδίοδος, μια συστοιχία φωτοδiodών ή μια συσκευή συζευγμένης φόρτισης (charge-coupled device, CCD). Ένα φασματοφωτόμετρο μπορεί να έχει είτε μονή είτε διπλή δέσμη.

4.4.: Φασματοσκοπία Φθορισμού και Προσδιορισμός Κβαντικών

Αποδόσεων μέσω Φθορισμού

Φωταύγεια είναι η εκπομπή φωτός λόγω της αποδιέγερσης μιας διεγερμένης κατάστασης ενός μορίου (φθορισμός, φωσφορισμός, χημειοφωταύγεια). Κάποιοι παράγοντες που επηρεάζουν τον φθορισμό και τον φωσφορισμό είναι η μοριακή

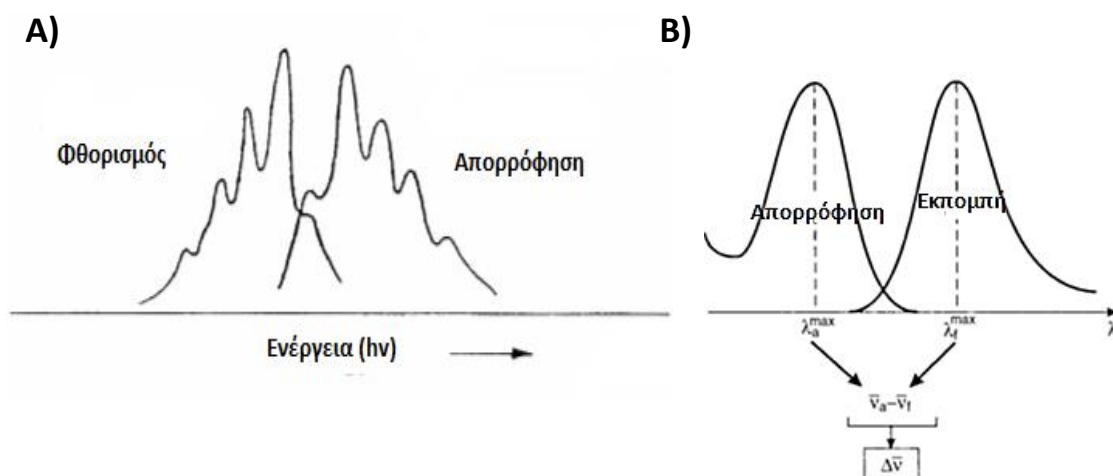


Εικόνα 36: Διάγραμμα Jablonski

δομή και το χημικό περιβάλλον και αυτοί συνήθως καθορίζουν επίσης και την ένταση της εκπομπής. Γνωρίζοντας το διάγραμμα Jablonski, το οποίο παρουσιάζεται στην Εικόνα 36, είναι φανερό πως η αποδιέγερση με εκπομπή φωτονίου από το ενεργειακό επίπεδο της πρώτης διεγερμένης κατάστασης (S_1) στο ενεργειακό επίπεδο S_0 ονομάζεται φθορισμός.

Επειδή οι δονητικές διαδικασίες χαλάρωσης στην διεγερμένη κατάσταση συμβαίνουν μετά από την απορρόφηση φωτός, αυτές δεν αντικατοπτρίζονται στα φάσματα απορρόφησης. Παρομοίως, επειδή οι δονητικές διαδικασίες χαλάρωσης στην θεμελιώδη κατάσταση συμβαίνουν μετά την εκπομπή φωτός, αυτές δεν αντικατοπτρίζονται στα φάσματα φθορισμού. Δεδομένου ότι όλες οι απορροφήσεις θεωρείται ότι προκύπτουν από το ίδιο επίπεδο δόνησης της ηλεκτρονικά διεγερμένης κατάστασης (έχοντας τη γεωμετρία της κατάστασης ισορροπίας που ονομάζεται Frank-Condon διεγερμένη κατάσταση), τα φάσματα απορρόφησης αντικατοπτρίζουν τη δονητική κατάσταση της Frank-Condon διεγερμένης κατάστασης. Επειδή ο φθορισμός προκύπτει από το ίδιο επίπεδο δόνησης της χαμηλότερης απλής διεγερμένης κατάστασης και μεταπίπτει στα διάφορα δονητικά επίπεδα της ηλεκτρονιακής θεμελιώδους ή βασικής κατάστασης (έχοντας τη γεωμετρία της κατάστασης ισορροπίας και ονομάζεται θεμελιώδης κατάσταση Frank-Condon), το φάσμα φθορισμού αντανakλά το δονητική θεμελιώδους κατάστασης Frank-Condon.

Η εφαρμογή της αρχής Franck-Condon τόσο στην απορρόφησης, όσο και στο φθορισμό, μαζί με τον κανόνα Kasha οδηγεί σε ένα φάσμα εκπομπής που εμφανίζεται κατά προσέγγιση ως η κατοπτρική εικόνα της απορρόφησης. Η 0-0 δονητική μετάβαση, κοινή και στα δύο φάσματα, αντιστοιχεί στο σημείο διασταύρωσης τους (Εικόνα 37Α).⁵⁹



Εικόνα 37: Σχέση κατοπτρικής συμμετρίας μεταξύ φάσματος φθορισμού και φάσματος απορρόφησης **A)** γενικού φάσματος και **B)** σε σχέση με την μετατόπιση Stokes⁵⁹

Επιπρόσθετα, σε αυτό το σημείο, πρέπει να γίνει αναφορά στην μετατόπιση Stokes, οποία είναι το ενεργειακό χάσμα μεταξύ του μέγιστου της πρώτης ζώνης απορρόφησης και του μέγιστου του φάσματος φθορισμού (εκφραζόμενο σε κυματαριθμούς), όπως φαίνεται στην εικόνα 37B.

$$\widetilde{\Delta\nu} = \widetilde{\nu}_a - \widetilde{\nu}_f \quad (\text{E16})$$

Επειδή η διασυστημική διασταύρωση και η εσωτερική μετατροπή ανταγωνίζονται τον φθορισμό για την απενεργοποίηση της χαμηλότερης απλής διεγερμένης κατάστασης, δεν θα επιστρέψουν όλα τα πιθανώς διεγερμένα μόρια στην θεμελιώδη κατάσταση με φθορισμό. Το κλάσμα των διεγερμένων μορίων που επιστρέφει στη θεμελιώδη κατάσταση S_0 με εκπομπή φωτονίων φθορισμού ονομάζεται κβαντική απόδοση φθορισμού Φ_F και υπό δεδομένες συνθήκες θερμοκρασίας και περιβάλλοντος, αποτελεί ένα βασικό χαρακτηριστικό των μορίων, αφού μπορεί να προσφέρει επιπλέον πληροφορίες, όπως για παράδειγμα στη στατική απόσβεση του φθορισμού η οποία δεν επηρεάζει τον χρόνο ζωής του μορίου. Η κβαντική απόδοση δίνεται από τον τύπο

$$\Phi_F = \frac{k_f}{k_f + k_{isc} + k_{ic}} = k_{total} \tau_s \quad \text{ή} \quad \tau_0 = \frac{\tau_s}{\Phi_F} \quad (\text{E17})$$

όπου k_f η σταθερά ταχύτητας μέσω εκπομπής φθορισμού, $S_1 \rightarrow S_0$ (ακτινοβόλος διεργασία), k_{isc} η σταθερά ταχύτητας διασυστημικής διασταύρωσης, $S_1 \rightarrow T_1$ (μη ακτινοβόλος διεργασία), k_{ic} σταθερά ταχύτητας μέσω εσωτερικής μετατροπής, $S_1 \rightarrow S_0$ (μη ακτινοβόλος διεργασία), k_{total} το άθροισμα των 3 παραπάνω σταθερών ταχύτητας, τ_s ο παρατηρούμενος ακτινοβόλος χρόνος ζωής και τ_0 ο φυσικός ακτινοβόλος χρόνος ζωής.

Οι κβαντικές αποδόσεις φθορισμού συνήθως προσδιορίζονται με ολοκλήρωση του φάσματος φθορισμού και επακόλουθη κανονικοποίηση χρησιμοποιώντας ένα

πρότυπο γνωστής κβαντικής απόδοσης φθορισμού ώστε να απαλλαγούμε από τον συντελεστή k που εμφανίζεται στην εξίσωση E17. Η κβαντική απόδοση υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$\Phi_x = \Phi_r (F_x/F_r) \cdot (A_r/A_x) \cdot (n_x^2/n_r^2) \quad (\text{E18})$$

Στην παραπάνω εξίσωση, Φ_x , είναι η κβαντική απόδοση του φθορισμού, όπου F το εμβαδόν του μη κανονικοποιημένου φάσματος φθορισμού ή εναλλακτικά της έντασης φθορισμού, n ο δείκτης διάθλασης του δείγματος και της ένωσης αναφοράς, A η απορρόφηση του διαλύματος στο μήκος κύματος της διέγερσης, οι δείκτες ' r ' και ' x ' αναφέρονται στα δείγματα αναφοράς και άγνωστης ένωσης αντίστοιχα.⁶⁰ Οι απορροφήσεις που πρέπει να έχουν τα δείγματα προς μέτρηση και το πρότυπο στο μήκος κύματος της διέγερσης είναι 0,05-0,2 έτσι ώστε να υπάρχει γραμμικότητα μεταξύ του φθορισμού συναρτήσει της συγκέντρωσης και να μην υπάρχει το φαινόμενο εσωτερικού φίλτρου.⁶¹ Επιπρόσθετα, ο φθορισμός είναι μια εξαιρετικά ευαίσθητη διεργασία διότι επηρεάζεται από κάποιες άλλες διεργασίες που μπορούν να προκαλέσουν μείωση του φθορισμού, η οποία ονομάζεται απόσβεση. Κάποιοι παράγοντες απόσβεσης είναι οι εξής:

- Το ατμοσφαιρικό οξυγόνο,
- συγκρούσεις με βαρέα άτομα (όπως το ιώδιο και το βρώμιο),
- η δημιουργία συμπλόκων,
- η μεταφορά ηλεκτρονίων,
- η δημιουργία διεγερμένων διμερών (excimer, excited dimer),
- η δημιουργία διεγερμένων συμπλόκων (exciplex, excited complex),
- η μεταφορά πρωτονίων και
- η μεταφορά ενέργειας.

Τέλος, όπως είναι γνωστό, η ενέργεια που απαιτείται για να υπάρξει μετάβαση σε μία διεγερμένη κατάσταση επιτυγχάνεται με μελέτη του φάσματος απορρόφησης ή εκπομπής του συγκεκριμένου μελετούμενου μορίου σε συνδυασμό με την εξής εξίσωση:

$$\Delta E = E_2 - E_1 = h\nu \quad (\text{E19})$$

όπου h είναι η σταθερά Planck, ν η συχνότητα (σε sec^{-1}) στην οποία έχουμε απορρόφηση, και τα E_2 και E_1 είναι οι ενέργειες ενός μόνο μορίου στην τελική και αρχική κατάσταση αντίστοιχα. Η θέση μίας ζώνης απορρόφησης συχνά εκφράζεται από το μήκος κύματος της σε nm ή από τον κυματάρημο ($\tilde{\nu} = 1/\lambda$) σε αντίστοιχα sec^{-1} . Γι' αυτό η εξίσωση E19 μπορεί να γραφτεί ως εξής:

$$E_2 - E_1 = h\tilde{\nu}c = 2,86 \cdot 10^{-3} \tilde{\nu} \text{ cm}^{-1} \text{ (σε kcal/mole)} \quad (\text{E20})$$

$$E_2 - E_1 = \frac{2,86 \cdot 10^4}{\lambda \text{ (nm)}} \quad (\text{E21})$$

όπου E_2 και E_1 είναι οι ενέργειες ενός μόνο μορίου στην τελική και αρχική κατάσταση αντίστοιχα, και $\tilde{\nu}$ και λ είναι η θέση της απορρόφησης εκφρασμένη σε κυματάρημο και μήκος κύματος αντίστοιχα.⁶² Για να βρεθεί πειραματικά η τιμή της ενέργειας απλής κατάστασης τότε χρησιμοποιείται ο παραπάνω τύπος βάζοντας ως λ το σημείο τομής των πειραματικών φασμάτων διέγερσης (απορρόφηση) και εκπομπής, δηλαδή το σημείο 0-0 της δονητικής μετάβασης όπως περιεγράφηκε παραπάνω.

4.5.: In vitro εφαρμογή σε καρκινικά και υγιή επιθηλιακά κύτταρα

Τα τελευταία χρόνια, όπως έχει ήδη αναφερθεί παραπάνω, τα CPNs βρίσκουν εφαρμογή σε βιολογικές εφαρμογές. Το πρώτο στάδιο που πρέπει κάποιος να μελετήσει είναι τα πειράματα in vitro. Δηλαδή πειράματα των νανοσωματιδίων

αυτών σε κάποιες κυτταρικές σειρές έτσι ώστε να γίνει ένας έλεγχος κυτταροτοξικότητάς τους στα κύτταρα, καθώς και βιοαπεικόνιση των κυττάρων με τα νανοσωματίδια. Συγκεκριμένα, στην παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία θα γίνει αναφορά στην δυνατότητα ανάπτυξης (proliferation) των κυττάρων μαζί με NPs με την τεχνική του IncuCyte, απεικόνιση μέσω φθορισμού (confocal microscopy) κυττάρων και NPs. Οι τεχνικές αυτές θα αναλυθούν στα παρακάτω υποκεφάλαια.

4.5.1.: Μέθοδος Ζωντανής Απεικόνισης IncuCyte®

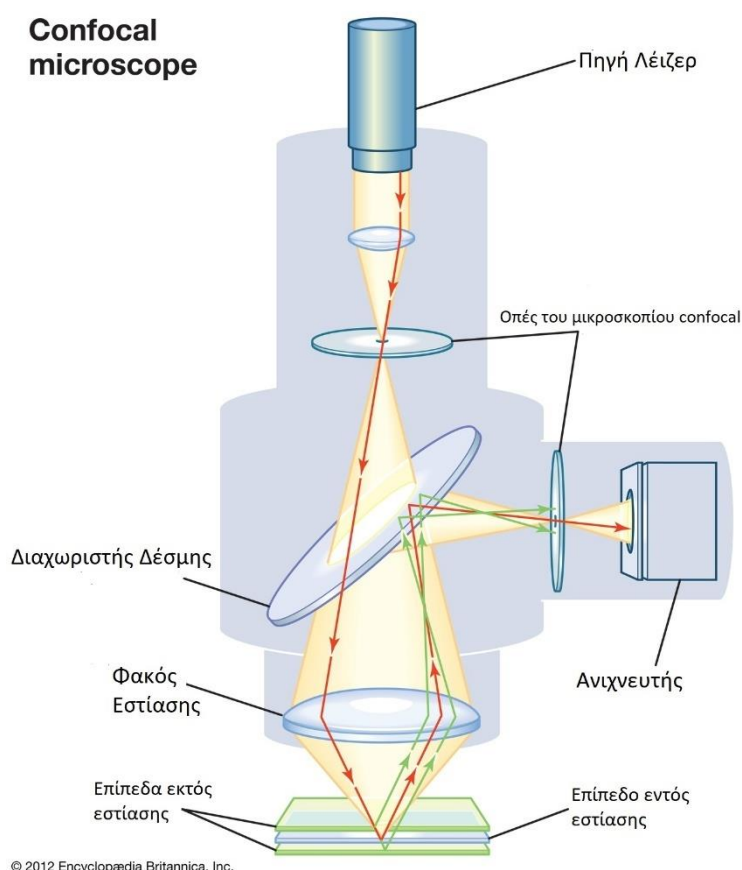
Το IncuCyte® είναι ένα ζωντανό σύστημα απεικόνισης που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μια ποικιλία τεχνικών καθώς μπορεί να παρακολουθεί τα κύτταρα ενώ αναπτύσσονται σε έναν επωαστικό θάλαμο. Οι παράμετροι και η ανάλυση μπορούν να ελεγχθούν μέσω του αποκλειστικού λογισμικού της (IncuCyte® ZOOM). Είναι ένα μηχάνημα που απαρτίζεται από ένα επωαστικό θάλαμο που έχει ενσωματωμένο μικροσκόπιο με διάφορους φακούς, όπως 4x, 10x, 20x κτλ, το οποίο μετακινείται όσο γίνεται η μέτρηση έτσι ώστε να πηγαίνει στην επιθυμητή τοποθεσία κάθε τρυβλίου διαφορετικών φρεατίων. Επίσης, δίνει την δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί και η δυνατότητα φθορισμού στα κύτταρα σε κόκκινη και πράσινη φάση.

Το IncuCyte® ZOOM εισάγει μια καινοτόμο πλατφόρμα για την απόκτηση, ανάλυση και ποσοτικοποίηση εικόνων από ζωντανά κύτταρα που παραμένουν ανεπηρέαστα από τη μέθοδο ανίχνευσης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Είναι μια στρατηγική που αναφέρεται ως ζωντανή απεικόνιση περιεχομένου. Επιπλέον, το IncuCyte® ZOOM διαθέτει μια ισχυρή βάση δεδομένων που έχει σχεδιαστεί για να διευκολύνει τους χρήστες να αναζητούν και να ανακτούν πειραματικά δεδομένα χρησιμοποιώντας ένα ενοποιημένο εργαλείο αναζήτησης. Ο σχεδιασμός του λογισμικού IncuCyte® ZOOM παρέχει ευελιξία στο σχεδιασμό κυτταρικών πρωτοκόλλων καθώς και στην παροχή εύχρηστων, εξελιγμένων εργαλείων ανάλυσης. Αυτά τα αναλυτικά εργαλεία επιτρέπουν στους χρήστες να μεταφράζουν ποιοτικές παρατηρήσεις σε ποσοτικά δεδομένα προκειμένου να διευκολύνουν τη λήψη αποφάσεων βάσει δεδομένων. Οι απλές επιλογές εξαγωγής εικόνων, η ανάμειξη καναλιών και η μίξη και τα εργαλεία δημιουργίας ταινιών παρέχουν ένα μέσο για την εύκολη ενσωμάτωση των δεδομένων που παράγονται από το IncuCyte® ZOOM σε παρουσιάσεις, αφίσες και δημοσιεύσεις.

Το IncuCyte® ZOOM προσφέρει στους χρήστες τη δυνατότητα να αποκτήσουν εκτός της φάσης HD, και εικόνες φθορισμού διπλού μήκους κύματος ζωντανών κυττάρων - παράγοντας πολυπλεξικά δεδομένα που μπορούν να μετρήσουν κινητικά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την απόπτωση, την κυτταροτοξικότητα και άλλες εφαρμογές βιολογίας των κυττάρων. Ο εκλεπτυσμένος επεξεργαστής του IncuCyte® ZOOM είναι σε θέση να διακρίνει με ακρίβεια μεταξύ αντικειμένων φόντου και θετικού φθορισμού σε ένα ευρύ φάσμα τύπων κυττάρων και εντάσεων φθορισμού. Με αυτήν τη δυνατότητα, ένας χρήστης του IncuCyte® ZOOM έχει τη δυνατότητα να προσαρμόζει τις παραμέτρους επεξεργασίας για την καλύτερη ανάλυση ενός συγκεκριμένου φαινοτύπου κυττάρων.

4.5.2.: Συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού (Confocal Microscopy)

Εξέλιξη της μικροσκοπίας φθορισμού αποτελεί η συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης με laser (Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM). Η συνεστιακή μικροσκοπία είναι μια εξειδικευμένη μορφή τυπικής μικροσκοπίας φθορισμού, η οποία χρησιμοποιεί συγκεκριμένες οπτικές παραμέτρους για τη δημιουργία εικόνων υψηλής ανάλυσης υλικού που βάφεται με ανιχνευτές φθορισμού. Υπήρξαν πολλές προσπάθειες στο τέλος του μισού του 20^{ου} αιώνα να επιτευχθεί βελτιωμένη ανάλυση εικόνας για μικροσκοπία φθορισμού με χρήση διαφόρων ανοιγμάτων, ωστόσο, η διαθεσιμότητα λέιζερ υψηλής έντασης και ευαίσθητων ηλεκτρονικών ανιχνευτών είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή εμπορικών συνεστιακών μικροσκοπίων στις αρχές της δεκαετίας του 1990. Το τεράστιο πλεονέκτημα της ανάλυσης εικόνας και της



Εικόνα 38: Σχηματική Απεικόνιση λειτουργίας του συνεστιακού μικροσκοπίου σάρωσης με λέιζερ.

ανίχνευσης που κατέστη δυνατή από εμπορικά παραγόμενα συνεστιακά μικροσκόπια σάρωσης λέιζερ οδήγησε σε ευρεία υιοθέτηση της χρήσης τους. Η συνεστιακή μικροσκοπία διαφέρει από τη συμβατική μικροσκοπία φθορισμού ευρέως πεδίου στο γεγονός ότι η οπτική διαδρομή έχει σχεδιαστεί για να τοποθετεί μπροστά από τον ανιχνευτή εικόνας (σωλήνας φωτοπολλαπλασιαστή ή κάμερα) ένα άνοιγμα σε σημείο όπου η εικόνα εστιάζεται σε συνδυασμό με το εστιακό επίπεδο της εικόνας.⁶³ Αναλυτικότερα, το φως ταξιδεύει μέσα από το δείγμα με ένα συμβατικό μικροσκόπιο στο σημείο που μπορεί να διεισδύσει, ενώ ένα συνεστιακό μικροσκόπιο εστιάζει μόνο μια μικρότερη δέσμη φωτός σε ένα στενό επίπεδο βάθους κάθε φορά. Το συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης λέιζερ επιτυγχάνει ένα ελεγχόμενο και πολύ περιορισμένο βάθος εστίασης (Εικόνα 38).

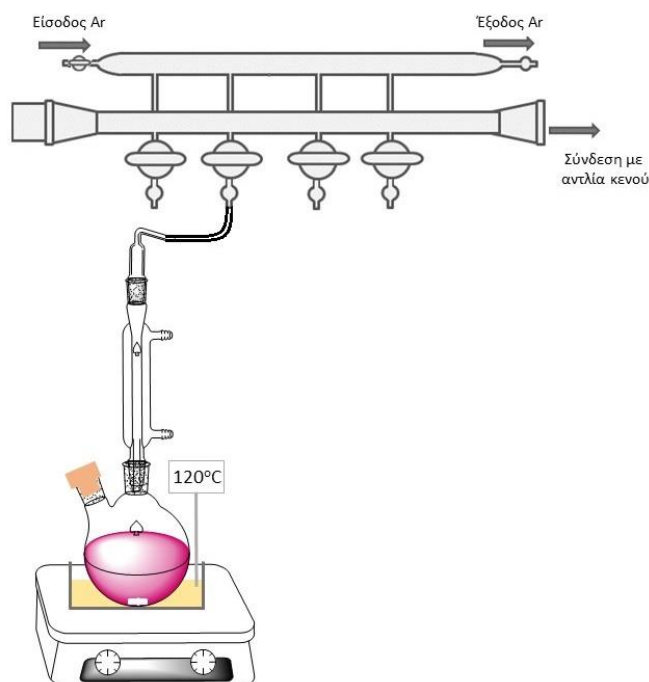
Κεφάλαιο 5: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1. Οργανολογία

Η λήψη των φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ πραγματοποιήθηκαν σε όργανο τύπου **Bruker AV 400 MHz**, τα διαγράμματα GPC σε **PL-GPC 220 High Temperature Chromatograph (Agilent Technologies)** σε θερμοκρασία 150°C και ρυθμό ροής 1ml/min και η κυκλική βολταμετρία με ηλεκτρόδιο αναφοράς **Ag/AgCl**. Οι μετρήσεις DLS και του δυναμικού ζ έγιναν σε μηχανήμα **Zetasizer NanoZS (ZEN3600) (Malvern Instruments, UK)** εξοπλισμένο με λέιζερ He-Ne (632.8nm), ενώ οι μετρήσεις έγιναν με γωνία σκέδασης 173° . Επιπλέον, για τη λήψη των φασμάτων απορρόφησης υπεριώδους χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο **UV-VIS Analytik Jena AG Germany, Specord 205** και για τη λήψη φασμάτων φθορισμού το φθορισμόμετρο **Edinburgh FS5** με λογισμικό Fluoracle.

Οι εικόνες AFM ελήφθησαν με μικροσκόπιο ατομικής δύναμης **Bruker Multimode Nanoscope 3D**. Το συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού που χρησιμοποιήθηκε είναι το **Leica SP5** (Ινστιτούτο Βιοϊατρικών Ερευνών/IBE-ITE, Ιωάννινα) εξοπλισμένο με λέιζερ Argon/SS-561/HeNe

5.2.: Σύνθεση Συζυγιακών Πολυμερών μέσω της αντίδρασης Stille και καθαρισμός τους μέσω εκχύλισης Soxhlet



Εικόνα 39: Πειραματική Διάταξη Πολυμερισμού μέσω αντίδρασης Stille.

Αρχικά, σε μια δίλαιμη σφαιρική προσαρμόζεται ψυκτήρας και ελαστικό πώμα (septum). Μέσω ελαστικού σωλήνα και εσφυρίσματος συνδέεται με την γραμμή αργού-κενού (Εικόνα 39). Η ήδη απαλλαγμένη από υγρασία φιάλη υπόκειται σε περεταίρω ξήρανση με την βοήθεια φλόγας πραγματοποιώντας 3 κύκλους αργού-κενού.

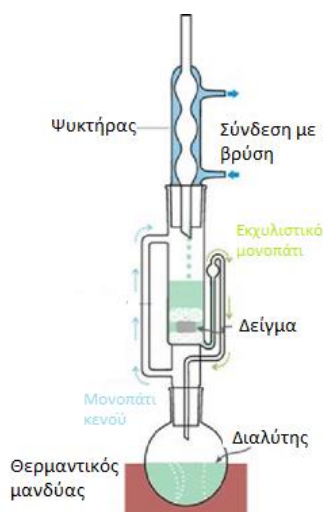
Στη συνέχεια, προστίθενται οι κατάλληλες ποσότητες αντιδραστηρίων, μέσω του ελαστικού πώματος, στην απαλλαγμένη από υγρασία και οξυγόνο φιάλη. Με την χρήση μιας δεύτερη δίλαιμης σφαιρικής φιάλης συλλέγεται ο διαλύτης του

πολυμερισμού από την συσκευή επαναρροής/ξήρανσης. Το ξηραντικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε είναι το υδρίδιο του ασβεστίου και ο διαλύτης παρέμεινε σε διαδικασία επαναρροής για τουλάχιστον 3 ώρες πριν χρησιμοποιηθεί. Ο ξηρός διαλύτης προστίθεται στην φιάλη πολυμερισμού με τη βοήθεια σύριγγας μέσω του septum. Το διάλυμα του πολυμερισμού ακολούθως, απαερώνεται με την βοήθεια 5 κύκλων αργού-κενού.

Τελικώς, η συσκευή πολυμερισμού τοποθετείται προσεχτικά στο ελαιόλουτρο. Η αντίδραση πραγματοποιείται υπό ροή αργού στους 120°C για 24 ώρες. Ο τερματισμός του πολυμερισμού γίνεται με απενεργοποίηση της ανάδευσης και της θέρμανσης και τέλος πραγματοποιείται καταβύθιση του διαλύματος πολυμερούς σε αναδευόμενη μεθανόλη ή MeOH (σε ποτήρι ζέσεως). Ο πολυμερισμός αφήνεται για 24-48 ώρες.

Το πολυμερές διηθείται μέσω χάρτινου ηθμού και το στερεό πολυμερές τοποθετείται σε συσκευή εκχύλισης Soxhlet (Εικόνα 40). Κατασκευάζεται απλός ηθμός και γίνεται διήθηση του πολυμερούς που βρίσκεται στη μεθανόλη. Με υδροβολέα MeOH ρίχνουμε γύρω γύρω πάνω στα τοιχώματα του ηθμού για να μαζευτεί ομοιόμορφα όλο μαζί προς το κέντρο του ηθμού κάτω. Αυτός ο ηθμός χρησιμοποιείται για καθαρισμό του πολυμερούς με εκχύλιση Soxhlet.

Εκχύλιση Soxhlet



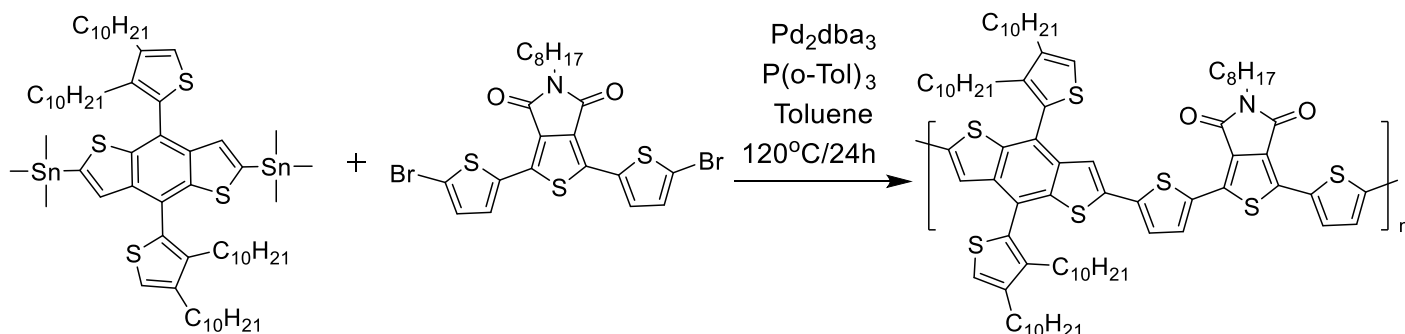
Εικόνα 40: Πειραματική Διάταξη εκχύλισης Soxhlet.

Διάταξη συσκευής:

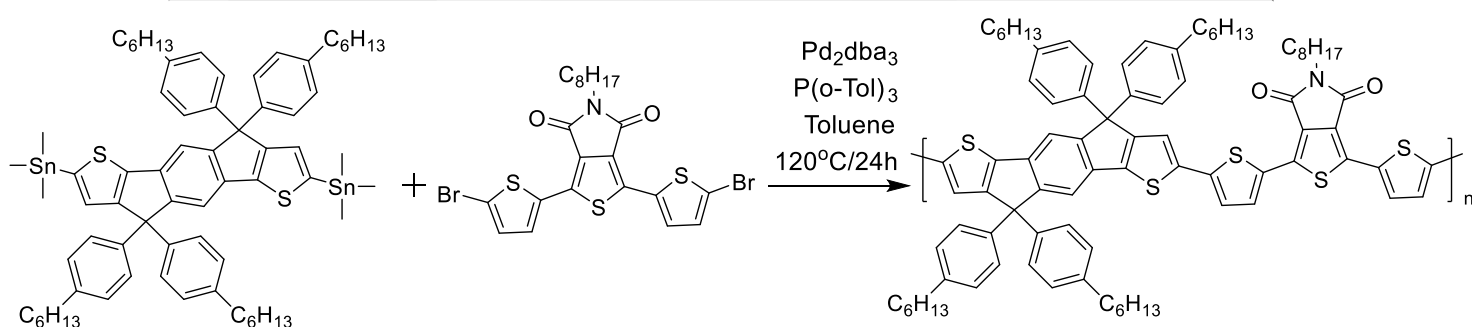
Η συσκευή Soxhlet που περιέχει τον ηθμό με το πολυμέρες προς καθαρισμό, προσαρμόζεται σε μια σφαιρική φιάλη που περιέχει διαλύτη όπως φαίνεται στην Εικόνα 40.

Ο καθαρισμός του πολυμερούς πραγματοποιείται μέσω της εκχύλισης **Soxhlet με 4 διαφορετικούς διαλύτες**. Διενεργείται πρώτα η εκχύλιση Soxhlet με διαλύτη μεθανόλη (MeOH), την επόμενη μέρα με διαλύτη ακετόνη (AcO), και την επόμενη μέρα με διαλύτη εξάνιο (Hexane). Τέλος, χλωροφόρμιο (CHCl₃) τοποθετείται σε καθαρή φιάλη το οποίο διαλυτοποιεί το απαλλαγμένο από υπολείμματα μονομερών και καταλύτη πολυμερές. Το πολυμερές συλλέγεται από την φιάλη μέσω καταβύθισης σε MeOH. Τέλος, το πολυμερές διηθείται σε χωνί Buchner και το

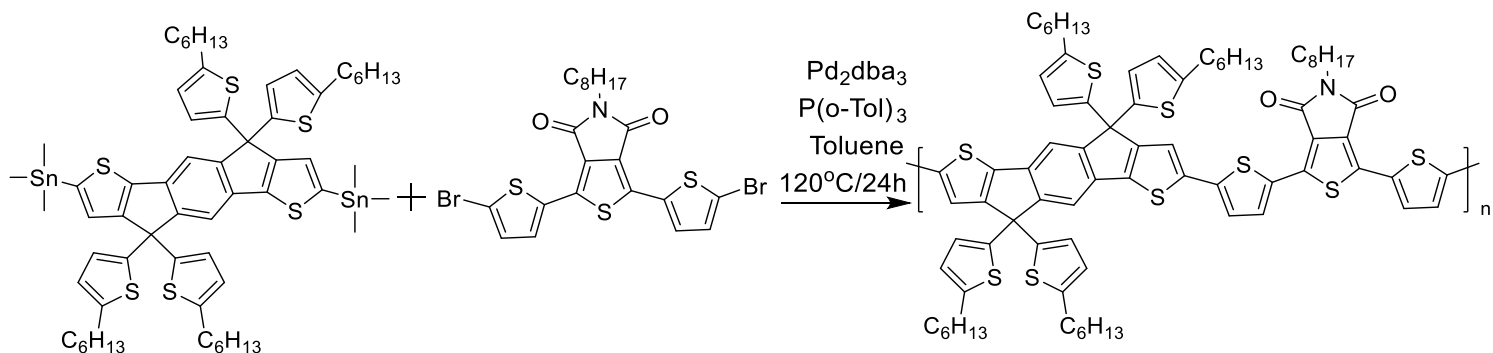
συλλέγεται σε γυάλινο μπουκαλάκι το οποίο τοποθετείται για ξήρανση σε φούρνο κενού. Την επόμενη μέρα, ζυγίζεται το πολυμερές και υπολογίζεται η απόδοση του πολυμερισμού. Τα τρία πολυμερή που συντέθηκαν φαίνονται στις ακόλουθες αντιδράσεις:



Αντίδραση πολυμερισμού Stille 1: Σύνθεση του BTTPD-Th ή CP1



Αντίδραση πολυμερισμού Stille 2: Σύνθεση του IDTDPD-Ph ή CP2



Αντίδραση πολυμερισμού Stille 3: Σύνθεση του IDTDPD-Th ή CP3

Τελικώς, δημιουργούνται καινούρια διαλύματα των πολυμερών σε διαλύτη CDCl_3 και έτσι πάρθηκε νέο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$, σε άλλα διαλύματα με διαλύτη 1,2-διχλωροβενζόλιο (ODCB) πάρθηκαν τα φάσματα GPC, σε διαλύτη THF πάρθηκαν τα UV-Vis και φθορισμού και μέτρηση των κβαντικών αποδόσεών τους.

5.3.:Σύνθεση Νανοσωματιδίων Συζυγιακών Πολυμερών

Έγινε κατασκευή νανοσωματιδίων και για τα 3 πολυμερή που συντέθηκαν παραπάνω με τις 2 μεθόδους που περιεγράφηκαν παραπάνω, δηλαδή με νανοκαταβύθιση και εγκλωβισμό. Έγινε βελτιστοποίηση των συνθηκών των διαδικασιών αυτών ύστερα από αλλαγές στις παραμέτρους των διαδικασιών, όπως η αναλογία μεταξύ πολυμερούς και αμφίφιλου, ή ο όγκος του νερού. Τελικά, έγινε η τελική κατάληξη των πρωτοκόλλων που περιγράφονται αναλυτικότερα παρακάτω.

Αφού έγινε η σύνθεσή τους, ακολούθησε ο χαρακτηρισμός τους με DLS, zeta δυναμικό, φάσματα UV-Vis και φθορισμού, και τέλος μέτρηση των κβαντικών αποδόσεων τους. Επιπλέον, έγινε και μέτρηση τους στο μέγεθος και στο z δυναμικό κάθε βδομάδα για περίπου 5-6 εβδομάδες συνολικά ώστε να διαπιστωθεί η σταθερότητά τους.

5.3.1.:Μέσω νανοκαταβύθισης (nanoprecipitation)

Η διαδικασία της νανοκαταβύθισης είναι η εξής:

- 1) Αρχικά, διαλύουμε το συζυγιακό πολυμερές σε διαλύτη THF. Παρασκευάστηκε διάλυμα με 1mg του συζυγιακού πολυμερούς σε 50ml διαλύτη THF.
- 2) Στη συνέχεια προσθέτουμε σε γυάλινο μπουκάλι 7ml H₂O και το τοποθετούμε σε μηχανήμα υπερήχων (sonication tip).
- 3) Ανοίγουμε τους υπερήχους και αρχίζουμε να προσθέτουμε στάγδην ποσότητα 0,6ml του διαλύματος του συζυγιακού πολυμερούς σε THF στο νερό με τη βοήθεια αυτόματης πιπέτας από το διάλυμα που παρασκευάστηκε παραπάνω
- 4) Μόλις προστεθεί όλη ποσότητα και μετά από περίπου 1min κλείνουμε τους υπερήχους και αφήνουμε το διάλυμα όλο το βράδυ για να εξατμιστεί το THF. Την επόμενη μέρα μετράμε τον όγκο για να δούμε αν έχει εξατμιστεί το THF.
- 5) Τέλος, γίνεται μέτρηση του μεγέθους των νανοσωματιδίων με DLS στους 25°C (θερμοκρασία δωματίου) και στους 37 °C (θερμοκρασία σώματος), καθώς και μέτρηση δυναμικού z (z potential). Επιπλέον έγινε και μικροσκοπία AFM σε αυτού του είδους τα νανοσωματίδια.

5.3.2.:Μέσω εγκλωβισμό (encapsulation)

Η διαδικασία του εγκλωβισμού έχει ως εξής:

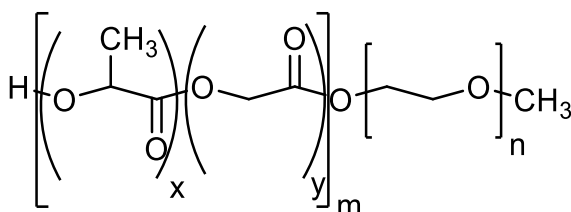
- 1) Αρχικά, παρασκευάζεται διάλυμα αμφίφιλου και συζυγιακού πολυμερούς σε αναλογία 9:1 (9mg: 1mg) αντίστοιχα σε διαλύτη THF(1ml).

Παρατήρηση: Πρώτα προστίθεται το συζυγιακό πολυμερές στον διαλύτη και αφού διαλυθεί, προστίθεται και η ποσότητα του αμφίφιλου.

- 2) Έπειτα, προσθέτουμε σε γυάλινο μπουκάλι 7ml H₂O και το τοποθετούμε στη συσκευή υπερήχων (sonication tip).
- 3) Ανοίγουμε τους υπερήχους και αρχίζουμε να προσθέτουμε στάγδην όλη την ποσότητα του διαλύματος του συζυγιακού πολυμερούς και του αμφίφιλου σε THF μέσα στο νερό με τη βοήθεια αυτόματης πιπέτας.

- 4) Μόλις προστεθεί όλη ποσότητα, αφήνουμε για περίπου 1min και στη συνέχεια κλείνουμε τους υπερήχους και αφήνουμε όλο το βράδυ για να εξατμιστεί το THF.
- 5) Την επόμενη μέρα μετράμε τον όγκο για να δούμε αν έχει εξατμιστεί το THF.
- 6) Τέλος, γίνεται μέτρηση του μεγέθους των νανοσωματιδίων με DLS στους 25°C (θερμοκρασία δωματίου) και στους 37 °C (θερμοκρασία σώματος), καθώς και μέτρηση δυναμικού z (z potential).

Το αμφίφιλο που χρησιμοποιήθηκε είναι το mPEG-b-PLGA [Poly(ethylene glycol) methyl ether – block – poly(lactide-co-glycolide) ή συμπολυμερές κατά συστάδες πολυαιθυλενογλυκόλης-πολυγαλακτικού -co- πολυγλυκολικού οξέος].



mPEG-b-PLGA

Poly(ethylene glycol) methyl ether – block – poly(lactide-co-glycolide)

Δεν μπόρεσαν να παρασκευαστούν πολλές παρτίδες από αυτά λόγω περιορισμένων ποσοτήτων των στερεών πολυμερών και κατά συνέπεια χρησιμοποιήθηκαν μόνο για τις χημικές μελέτες και όχι για τις βιολογικές της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

5.4.: Μικροσκοπία AFM

Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για την λήψη των εικόνων ήταν αυτή της περιοδικής επαφής (Tapping Mode) με χρήση ακίδων πυριτίου τύπου TAP300-G συχνότητας <10 nm και σταθερά δύναμης ~20–75 N.m⁻¹. Τα υμένια που μετρήθηκαν εναποτέθηκαν σε υποστρώματα πυριτίου (Si-wafers) με drop casting και η μέτρηση πραγματοποιήθηκε στο αποτύπωμα (ίχνος) της σταγόνας ύστερα από χρήση υδατόλουτρου υπερήχων για 20 λεπτά.

5.5.: Υπολογισμός Κβαντικών Αποδόσεων (Quantum Yields, QY)

Τα διαλύματα μετρήθηκαν, πρώτα, χρησιμοποιώντας ένα φασματοφωτόμετρο UV-VIS Analytik Jena AG Germany, Specord 205 χρησιμοποιώντας μια κυψελίδα χαλαζία μήκους διαδρομής 1cm για να διασφαλιστεί ότι οι απορροφήσεις κυμαίνονται από 0,05-0,2.⁶¹ Τα διαλύματα, τα οποία είναι διαλυμένα σε διαλύτη THF, πρέπει να έχουν THF απεσταγμένου που βρίσκεται σε ξηρές συνθήκες για να αποφευχθεί η παρεμβολή των σταθεροποιητών στη μέτρηση φθορισμού. Η μέτρηση φθορισμού γίνεται απουσία οξυγόνου. Αυτά γίνονται για να αποφευχθεί η απόσβεση του φθορισμού.

Η εκπομπή φθορισμού (PL) και η σχετική κβαντική απόδοση PL (PLQY) μετρήθηκαν με φασματοσκοπία PL χρησιμοποιώντας ως πρότυπο αραιό διάλυμα φλουρενόνης σε ακετονιτρίλιο (Φr = 0,032)⁶⁴ σε μήκος διέγερσης 380nm και απορρόφηση 0,05-0,2. Στο πρότυπο γίνεται συχνά μέτρηση, τουλάχιστον 1 φορά/εβδομάδα αν οι μετρήσεις γίνονται σε διαφορετικές βδομάδες. Όλα τα διαλύματα, το διάλυμα αναφοράς και τα

δείγματα, απορροφούν την ίδια ποσότητα φωτονίων και οι σχισμές (slit) εισόδου και εξόδου διατηρούνται σταθερές σε όλες τις μετρήσεις και διατηρείται η ίδια οπτική πυκνότητα. Όλες οι μετρήσεις φθορισμού πραγματοποιήθηκαν υπό ατμόσφαιρα αργού (bubbling για 10min). Έγινε διόρθωση σε όλα τα φάσματα και η ολοκλήρωση του κάθε φάσματος για τον υπολογισμό της κβαντικής απόδοσης έγινε σε μη κανονικοποιημένη μορφή φάσματος. Τα μήκη κύματος διέγερσης των πολυμερών και των νανοσωματιδίων τους φαίνονται στον πίνακα 1. Με βάση την εξίσωση E18 γίνεται ο υπολογισμός της κβαντικής απόδοσης του δείγματος.

Μήκη κύματος διέγερσης των πολυμερών (nm)				
Συντιθέμενα CPs		BTTPD-Th ή CP1	IDTDTPD-Ph ή CP2	IDTDTPD-Th ή CP3
Διαλύτης ή/και μορφή των CPs	Διαλύτης THF	590.0	580.0	570.0
	Υδατικά NPs μέσω νανοκαταβύθισης	560.0	544.0	540.0
	Υδατικά NPs μέσω εγκλωβισμού	565.0	545.0	545.0

Πίνακας 1: Μήκη κύματος διέγερσης όπου εξετάστηκαν στην φασματοσκοπία φθορισμού τα συντιθέμενα CPs και τα αντίστοιχα NPs τους.

5.6.: Καλλιέργεια καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων παχέος εντέρου HCT-116

Τα HCT-116 είναι ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου, τα οποία προέρχονται από ασθενή αρσενικού γένους με ορθοκολικό καρκίνωμα. Καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων HCT-116, αναπτύσσονται υπό συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας 37°C και ατμόσφαιρας εμπλουτισμένης σε 5% CO₂. Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιείται για την καλλιέργειά τους είναι το DMEM high glucose (PAN-biotech) περιεκτικότητας 4,5g/L D-γλυκόζης εμπλουτισμένο με 10% FBS, 100U/mL πενικιλίνη και 100mg/mL στρεπτομικίνης. Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων γίνεται όταν το 80-90% της επιφάνειας του τρυβλίου είναι καλυμμένο. Τότε πραγματοποιείται μία πλύση με PBS και έπειτα τα κύτταρα επωάζονται με τρυψίνη και μεταφέρονται σε νέα τρυβλία.

5.7.: Απομόνωση ενδοθηλιακών κυττάρων από φλέβα ομφάλιου λώρου (Huvcs)

Αρχικά, γίνεται λήψη 3 ή παραπάνω διαφορετικών ομφάλιων λώρων από τη γυναικολογική κλινική του Πανεπιστημιακού νοσοκομείου. Σε θάλαμο νηματοειδούς ροής γίνεται πλύση αυτών από το αίμα στην φλέβα με PBS. Οι ομφάλιοι λώροι έχουν δύο αρτηρίες και μία φλέβα. Η φλέβα είναι αυτή στην οποία γίνεται η όλη διαδικασία. Τοποθετούνται στην φλέβα σε κάθε άκρη του κάθε λώρου κάνουλες (staplecocks) και στερεώνονται με τη βοήθεια χειρουργικού νήματος. Γίνεται ξανά πλύση με PBS ώστε να φύγουν τυχόν υπολειπόμενα ερυθρά κύτταρα και για να γίνει έλεγχος καλής ροής καθώς και για την ύπαρξη διαρροής, η οποία δεν είναι επιθυμητή. Στη συνέχεια γεμίζονται με κολλαγενάση διαλύματος τύπου 1 (0,2% διαλυμένη σε PBS, Worthington, LS004196). Οι ομφάλιοι λώροι τοποθετούνται σε

βάζο με PBS, το οποίο έχει προθερμανθεί σε 37°C και τοποθετείται σε υδατόλουτρο ίδιας θερμοκρασίας για ακριβώς 13 λεπτά. Έπειτα, γίνεται έγχυση στην μία πλευρά της κάνουλας με 15-25ml θρεπτικού μέσου M199 με 10% ορό FBS και από την άλλη πλευρά της κάνουλας τοποθετείται falcon για να συγκεντρωθούν τα υγρά αυτά. Αυτό γίνεται για κάθε λώρο που συμμετέχει στην απομόνωση και τα υγρά που συγκεντρώνονται στο τέλος εφαρμόζεται φυγοκέντρηση σε αυτά με 1200rpm για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο μετά την φυγοκέντρηση απορρίπτεται προσεχτικά και το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται με θρεπτικό μέσο M199 (Life Technologies) full medium και μεταφέρονται σε τρυβλίο επικαλυμμένο με κολλαγόνο συγκέντρωσης 25mg/ml αρουραίου τύπου I (BD Biosciences Collagen Type I RatTail), το οποίο έχει επωαστεί για 30 λεπτά στους 37°C και πλυθεί 2 φορές με PBS πριν τη μεταφορά των κυττάρων. Το νέο ή νέα τρυβλία επωάζονται σε επωαστικό θάλαμο 37°C και ατμόσφαιρας εμπλουτισμένης σε 5% CO₂ όπου συνεχίζεται η ανάπτυξη τους και η ανακαλλιέργειά τους όπως περιγράφεται στο 5.6.

Το θρεπτικό μέσο M199 (Life Technologies) full medium αναφέρεται σε περιεκτικότητα D-γλυκόζης 1g/L, εμπλουτισμένο με 20% FBS, 0,08mg/ml εκχύλισμα ενδοθηλιακής ανάπτυξης (Endothelial Cell Growth Supplement, ECGS), 0,05U/ml ηπαρίνη, 100U/ml πενικιλίνη και 100μg/ml στρεπτομυκίνη.

5.8.: Καλλιέργεια ενδοθηλιακών κυττάρων απομονωμένων από φλέβα ομφάλιου λώρου (Huvcs)

Καλλιέργειες ενδοθηλιακών κυττάρων που απομονώθηκαν από φλέβα ομφάλιου λώρου αναπτύσσονται υπό συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας 37°C και ατμόσφαιρας εμπλουτισμένης σε 5% CO₂. Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιείται για την καλλιέργειά τους είναι το M199 (Life Technologies) με περιεκτικότητα D-γλυκόζης 1g/L, εμπλουτισμένο με 20% FBS, 0,08mg/ml εκχύλισμα ενδοθηλιακής ανάπτυξης (Endothelial Cell Growth Supplement, ECGS), 5 U/ml ηπαρίνη, 100U/ml πενικιλίνη και 100μg/ml στρεπτομυκίνη. Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων γίνεται όταν το 80-90% της επιφάνειας του τρυβλίου είναι καλυμμένο. Τότε πραγματοποιείται μία πλύση με PBS και έπειτα τα κύτταρα επωάζονται με τρυψίνη και μεταφέρονται σε νέα τρυβλία. Τα τρυβλία αυτά έχουν καλυφθεί με κολλαγόνο συγκέντρωσης 25mg/ml αρουραίου τύπου I (BD Biosciences Collagen Type I RatTail), επωαστεί για 30 λεπτά στους 37°C και πλυθεί 2 φορές με PBS πριν τη μεταφορά των κυττάρων.

5.9.: Κυτταροτοξικότητα κυττάρων μέσω της μεθόδου του IncuCyte®

Για τη μέθοδο της κυτταροτοξικότητας ή της ανάπτυξης των κυττάρων μαζί με τα νανοσωματίδια υπό μελέτη χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ζωντανής απεικόνισης IncuCyte®, που περιγράφεται αναλυτικά στο κεφάλαιο 4.5.1.

Για την ικανότητα ανάπτυξης των κυττάρων, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ζωντανής απεικόνισης IncuCyte® (Sartorius). Για τα HCT-116, στρώθηκαν για ανάπτυξη 10.000 κύτταρα σε τρυβλίο 96 φρεατίων σε τριπλέτες για κάθε διαφορετική περίπτωση (διαφορετική συγκέντρωση, control). Για τα HUVECs, πλάκες 96 φρεατίων επικαλύφθηκαν με κολλαγόνο αρουραίου τύπου I, επώαστηκαν σε 37°C, 5% CO₂ για 30 λεπτά και πλύθηκαν 2 φορές με PBS, όπου στρώθηκαν για ανάπτυξη 7.500 κύτταρα. Μετά από ολονύκτια επώαση των κυττάρων, πραγματοποιήθηκε κάθε επεξεργασία με τα νανοσωματίδια ή χωρίς και το τρυβλίο τοποθετήθηκε στο

IncuCyte®. Οι φωτογραφίες καθώς και η μετρήσεις λήφθηκαν κάθε 2-4 ώρες για 48 ώρες χρησιμοποιώντας φακό 10x. Οι μετρήσεις αυτές πραγματοποιήθηκαν με 3 επαναλήψεις για κάθε κυτταρική σειρά έτσι ώστε να υπάρχει επαναληψιμότητα στα αποτελέσματα, τα οποία θα παρουσιασθούν παρακάτω με τον μέσο όρο και την τυπική απόκλιση αυτών των επαναλήψεων.

Οι συγκεντρώσεις των νανοσωματιδίων στα κύτταρα που μελετήθηκαν είναι 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0325 και 0.01516 $\mu\text{g/ml}$. Επίσης, έγινε έλεγχος της επίδρασης του H_2O και ενός λεγόμενου διαλύματος «buffer NPs» (στο οποίο έγινε η διαδικασία της καταβύθισης με τις ίδιες ποσότητες χωρίς την ύπαρξη πολυμερούς για να ελεγχθεί τυχόν υπόλειμμα THF) στα κύτταρα χρησιμοποιώντας τις ίδιες ποσότητες για κάθε συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε. Αυτά θεωρήθηκαν σαν αρνητικά σημεία αναφοράς.

5.10.: Ανοσοφθορισμός

Με την τεχνική αυτή χρησιμοποιούνται φθορίζοντα αντισώματα για την ανίχνευση και εντόπιση αντιγόνου ή αντισώματος σε ιστούς ή κύτταρα. Για τον σκοπό αυτό, τα κύτταρα HCT-116 επιστρώθηκαν σε καλυπτρίδες, εντός τρυβλίου 24 φρεατίων και συγκεκριμένα σε αριθμό 70.000 κυττάρων σε κάθε φρεάτιο. Αφήνονται υπό επώαση για μία μέρα περίπου και την επόμενη γίνεται προσθήκη κάθε νανοσωματιδίου σε κάθε φρεάτιο με συγκέντρωση 0,5 $\mu\text{g/ml}$ για τα νανοσωματίδια μέσω καταβύθισης. Ύστερα αυτά αφήνονται για 24 ώρες υπό επώαση και δοκιμάστηκε μονιμοποίησή τους με 2 τρόπους:

✓ Μονιμοποίηση με παραφορμαλδεΰδη (PFA): Για τη μονιμοποίηση των κυττάρων γίνεται πλύση με PBS και προστίθεται διάλυμα παραφορμαλδεΰδης (PFA) 3,7% για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί δεύτερη πλύση με PBS και επώαση με 50mM NH_4Cl (σε PBS) για άλλα 15 λεπτά. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται επώαση με Triton-X 0.1% (σε PBS) για 4 λεπτά, ώστε να αυξηθεί η διαπερατότητα της μεμβράνης των κυττάρων. Ακολουθώντας, πραγματοποιείται μία πλύση με PBS και επώαση με ορό 10% (FCS) για 20 λεπτά προκειμένου να καλυφθούν οι μη ειδικές αντιγονικές θέσεις. Στη συνέχεια, γίνεται επώαση των κυττάρων με το πρωτογενές αντίσωμα σε 10% FCS για 1 ώρα. Με το πέρας της επώασης, ακολουθούν δύο πλύσεις με PBS των 5 λεπτών, υπό ανάδευση, ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του πρωτογενούς αντισώματος. Έπειτα, προστίθεται το δευτερογενές αντίσωμα σε 10% FCS που επωάζεται για 1 ώρα. Πραγματοποιούνται άλλες 2 πλύσεις με PBS των 5 λεπτών υπό ανάδευση. Οι καλυπτρίδες τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρες πλάκες με διάλυμα ProLong® Diamond Antifade Mountant reagent (ThermoFisher Scientific).

✓ Μονιμοποίηση με Μεθανόλη (MeOH): Για τη μονιμοποίηση των κυττάρων γίνεται πλύση με PBS και προστίθεται διάλυμα μεθανόλης για 10 λεπτά στους -20°C. Ακολουθεί δεύτερη πλύση με PBS και επώαση με ορό 10% (FCS) για 20 λεπτά προκειμένου να καλυφθούν οι μη ειδικές αντιγονικές θέσεις. Στη συνέχεια, γίνεται επώαση των κυττάρων με το πρωτογενές αντίσωμα σε 10% FCS για 1 ώρα. Με το πέρας της επώασης, ακολουθούν δύο πλύσεις με PBS των 5 λεπτών, υπό ανάδευση, ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του πρωτογενούς αντισώματος. Έπειτα, προστίθεται το δευτερογενές αντίσωμα σε 10% FCS που επωάζεται για 1 ώρα.

Πραγματοποιούνται άλλες 2 πλύσεις με PBS των 5 λεπτών υπό ανάδευση. Οι καλυπτρίδες τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρες πλάκες με διάλυμα ProLong® Diamond Antifade Mountant reagent (ThermoFisher Scientific)

Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα LAMP-1 και CD63. Η μέθοδος που έδειξε καλύτερα τα αντισώματα ήταν της μεθανόλης και προτιμήθηκε αυτή η μέθοδος μονιμοποίησης, καθώς και τα αποτελέσματά της.

Επίσης, έγινε μονιμοποίηση των κυττάρων HCT-116 χωρίς αντισώματα μόνο για την απεικόνιση των νανοσωματιδίων, καθώς και των κυττάρων HUVECs. Πραγματοποιήθηκε η ίδια διαδικασία αλλά τα νανοσωματίδια εξετάστηκαν σε διαφορετικούς χρόνους επώασης και μονιμοποιήθηκαν στην συνέχεια με τη μέθοδο της PFA μέχρι το στάδιο που προστίθεται το NH_4Cl και πλύση με PBS και έπειτα, οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες με ProLong® Diamond Antifade Mountant reagent (ThermoFisher Scientific). Επίσης, ο ίδιος τρόπος μονιμοποίησης χρησιμοποιήθηκε για την απεικόνιση των NPs σε διαφορετικούς χρόνους επώασης (15,30,60,90,120, 240 και 360min) στα κύτταρα HCT-116, αλλά και τη μελέτη έκκρισης των NPs από τα κύτταρα HCT-116 έως και 96h επώασης τους.

5.11.: Ζωντανή Κυτταρική Απεικόνιση με NPs

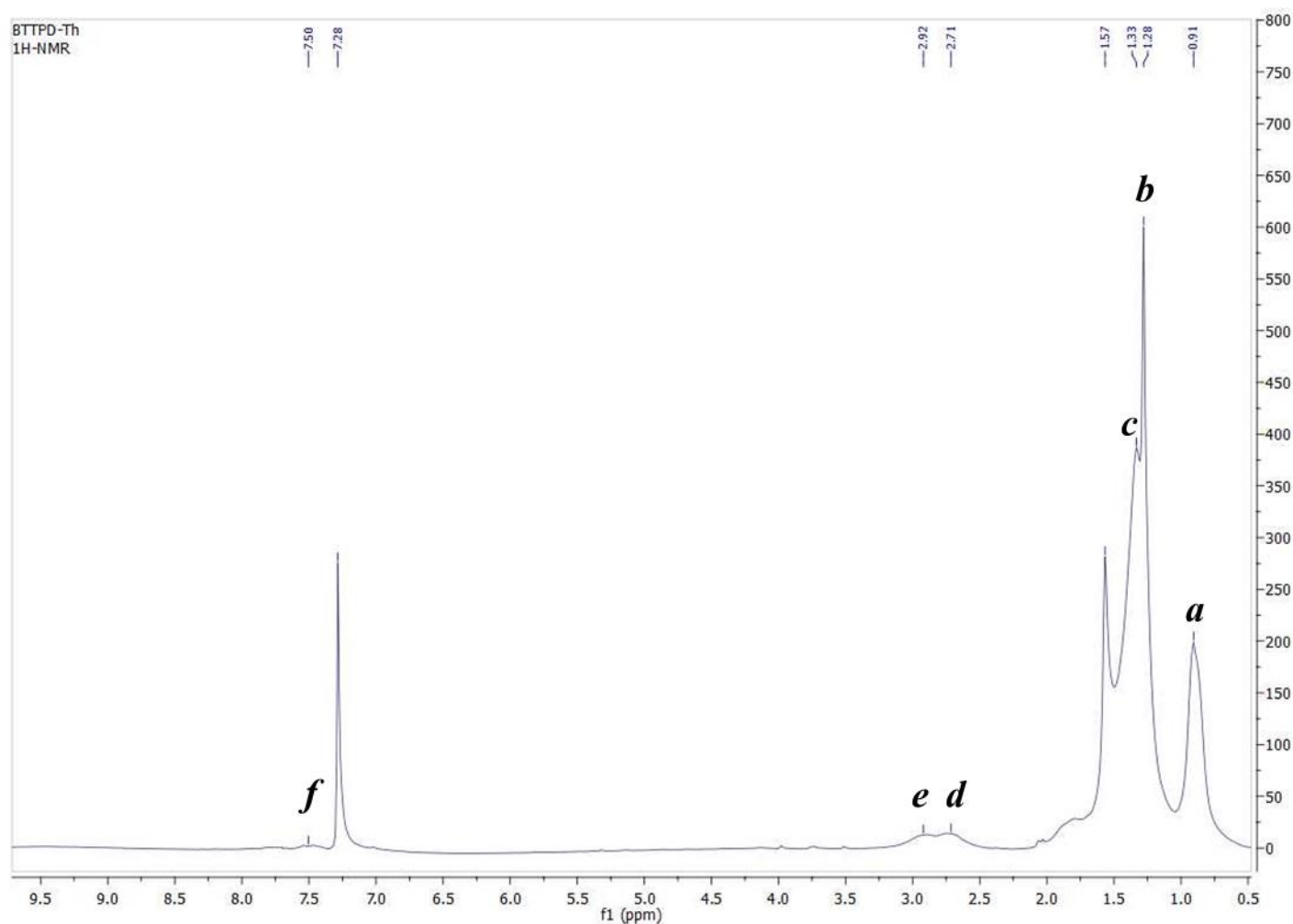
Η χρωστική Lucifer yellow είναι μια φθορίζουσα χρωστική που χρησιμοποιείται στη βιολογία των κυττάρων, η οποία βάφει και φθορίζει τα λυσοσώματα. Η βασική ιδιότητα του Lucifer yellow είναι ότι μπορεί να απεικονιστεί εύκολα τόσο σε ζωντανά όσο και σε σταθερά κύτταρα χρησιμοποιώντας μικροσκόπιο φθορισμού. Για τον σκοπό αυτό, τα κύτταρα HCT-116 επιστρώθηκαν σε καλυπτρίδες, εντός τρυβλίου 24 φρεατίων και συγκεκριμένα σε αριθμό 70.000 κυττάρων σε κάθε φρεάτιο. Αφήνονται υπό επώαση για μία μέρα περίπου και την επόμενη γίνεται προσθήκη κάθε νανοσωματιδίου σε κάθε φρεάτιο με συγκέντρωση 0,5μg/ml για τα νανοσωματίδια μέσω καταβύθισης. Έπειτα από 24 ώρες προστίθεται στο τρυβλίο αυτό 100μg/ml της χρωστικής σε θρεπτικό μέσο από stock 10mg/ml της Lucifer yellow διαλυμένης σε διασπασταγμένο νερό και αφήνεται για επώαση για 24 ώρες. Προστίθενται τα νανοσωματίδια καθώς και χλωροκίνη 100μM ως θετικό control σε ένα ξεχωριστό φρεάτιο. Αφήνονται στον επωαστικό θάλαμο για 24 ώρες και έπειτα γίνεται τοποθέτηση των καλυπτρίδων σε ειδικές αντικειμενοφόρες πλάκες αλουμινίου και η παρατήρησή τους γίνεται στο συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού (confocal) σε θερμαινόμενο θάλαμο 37°C με παροχή 5% CO_2 .

Κεφάλαιο 6: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ**6.1.: Χαρακτηρισμός των συντιθέμενων ενώσεων****6.1.1.: Ανάλυση Φάσματος $^1\text{H-NMR}$ & $^{13}\text{C-NMR}$**

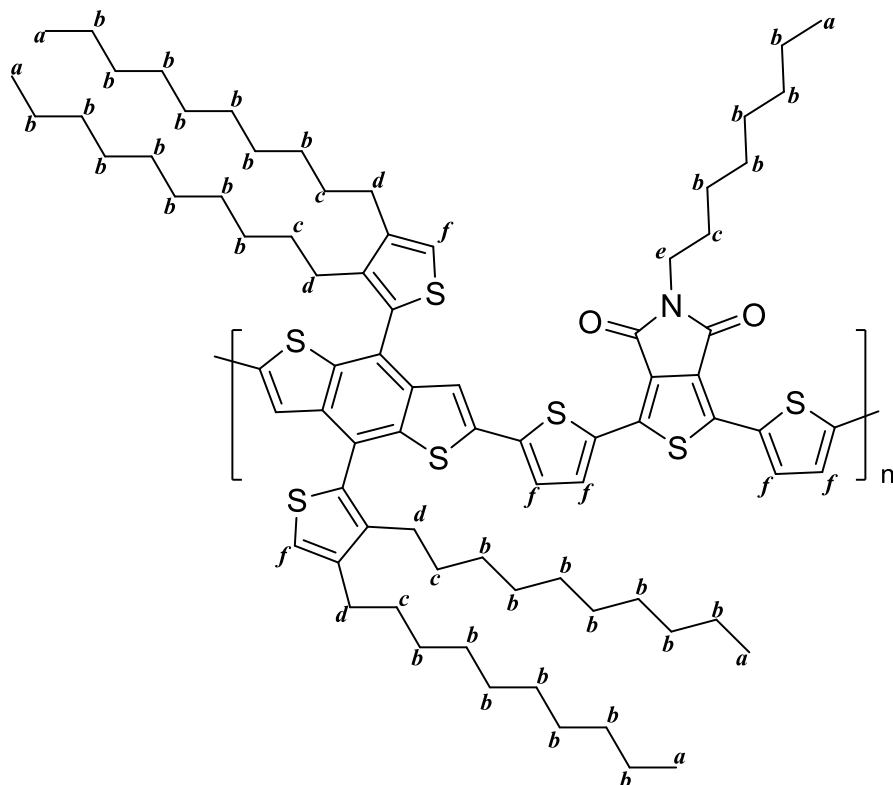
Στον φασματογράφο Bruker AV 400 MHz το δείγμα εισέρχεται από την κορυφή σε διαλύτη CDCl_3 . Στη συνέχεια εφαρμόζεται μαγνητικό πεδίο ρυθμιζόμενο από το χειριστή και τις δυνατότητες του φασματογράφου. Με τον όρο «δυνατότητες φασματογράφου» αναφερόμαστε στη διακριτική ικανότητα που έχει ο φασματογράφος ώστε κορυφές να μην χάνονται στον θόρυβο και επίσης να μπορούν να διαχωριστούν στην περίπτωση του πρωτονιακού NMR οι σχάσεις των κορυφών. Όταν γίνει συντονισμός των πρωτονιακού πυρηνικού σπιν δίνεται σήμα στον υπολογιστή και παίρνεται το φάσμα της ένωσης.

✓ **BTTPD-Th ή CP1**

Αρχικά, για το πολυμερές CP1 έχουμε τα εξής φάσματα $^1\text{H-NMR}$ & $^{13}\text{C-NMR}$:

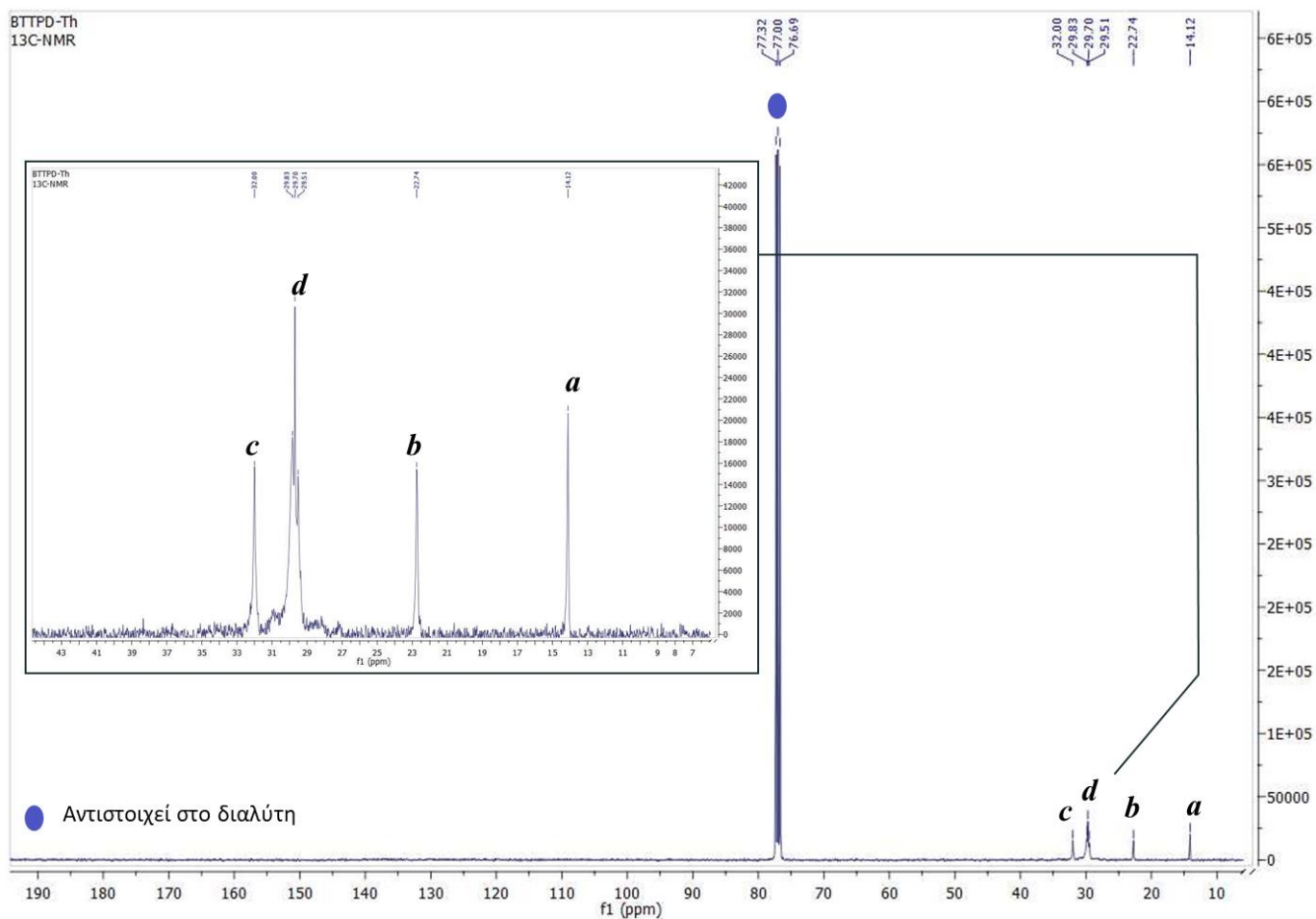


Σχήμα 1: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του CP1.

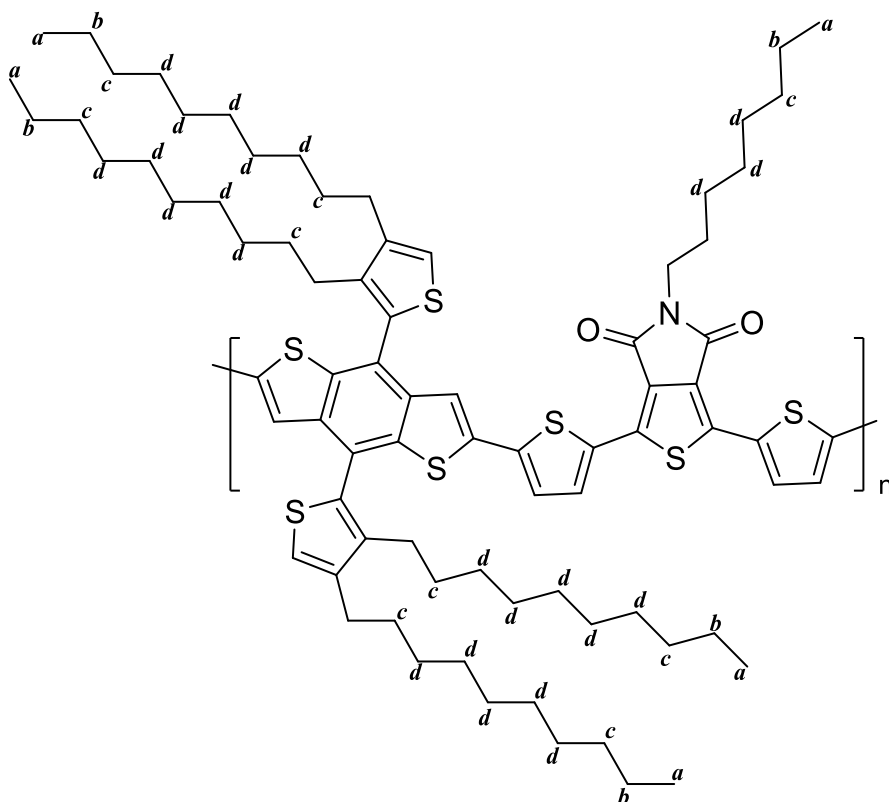


Στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ που προέκυψε, φαίνεται η αντιστοίχιση των πρωτονίων όπως έχουν συμβολιστεί λατινικά γράμματα. Ο ίδιος συμβολισμός γίνεται σε όλα τα φάσματα για όλα τα πολυμερή. Όπως είναι αναμενόμενο βλέπουμε τα πρωτόνια των $-\text{CH}_3$ ομάδων των αλειφατικών αλυσίδων να είναι στα χαμηλότερα ppm, δηλαδή στο υψηλότερο πεδίο αφού είναι τα πιο προστατευμένα. Ακολουθούν λίγο πιο ψιλά τα υπόλοιπα πρωτόνια των αλειφατικών αλυσίδων και καθώς πλησιάζουν στο αρωματικό σύστημα αποπροστατεύονται όπως επιβεβαιώνει και το φάσμα. Οι κορυφές στα 1,57 και 7,28 ppm αντιστοιχούν σε παρουσία πρωτονίων νερού και πρωτονίων του δευτεριωμένου διαλύτη (υπήρχε υγρασία πιθανώς στον διαλύτη) αντίστοιχα. Τέλος, κάποια από τα αρωματικά πρωτόνια του συζυγιακού συστήματος εντοπίζονται στα 7,5 ppm, όπως αναμενόταν. Δεν είναι εφικτό να αναγνωρίσει όμως όλα τα αρωματικά πρωτόνια πιθανώς λόγω χαμηλής ισχύος του φασματομέτρου και δομής του πολυμερούς, όπου τα πρωτόνια “κρύβονται” λόγω του δομικού συστήματος.

Ακολουθεί και το $^{13}\text{C-NMR}$ του 150, στο οποίο δεν φαίνονται οι αρωματικοί άνθρακες κυρίως, διότι το διάλυμα του υλικού σε CDCl_3 μετά από κάποια ώρα στο φασματογράφο NMR παγώνει και στερεοποιείται. Θα ήταν επιθυμητό να υπήρχε έλεγχος της θερμοκρασίας και να το διατηρεί ζεστό έτσι ώστε να μένει διαλυμένο. Κατά συνέπεια δεν έχουν φανεί όλες οι κορυφές, όπως θα αναμέναμε.

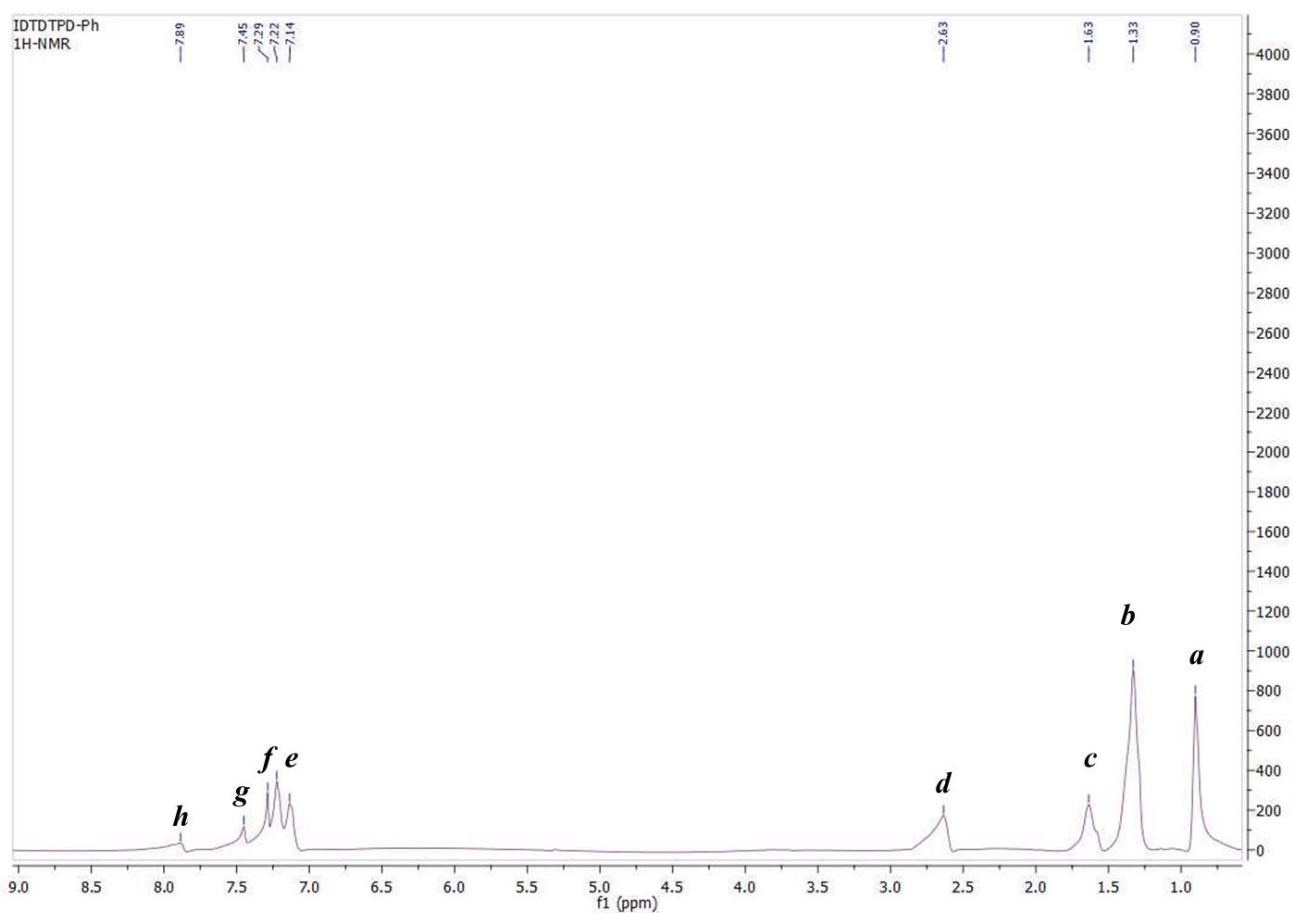
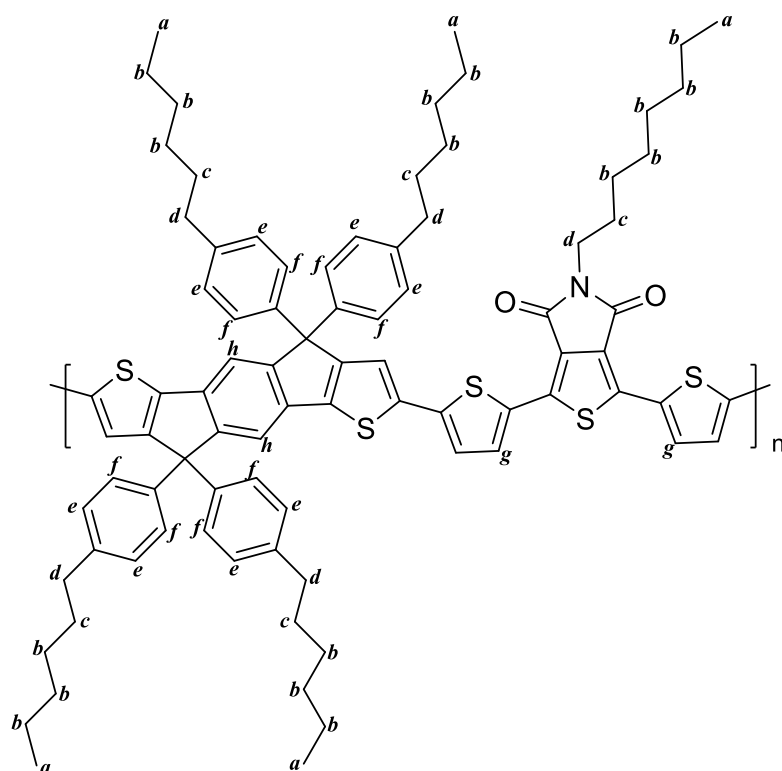


Σχήμα 2: Φάσμα ^{13}C -NMR του CP1.



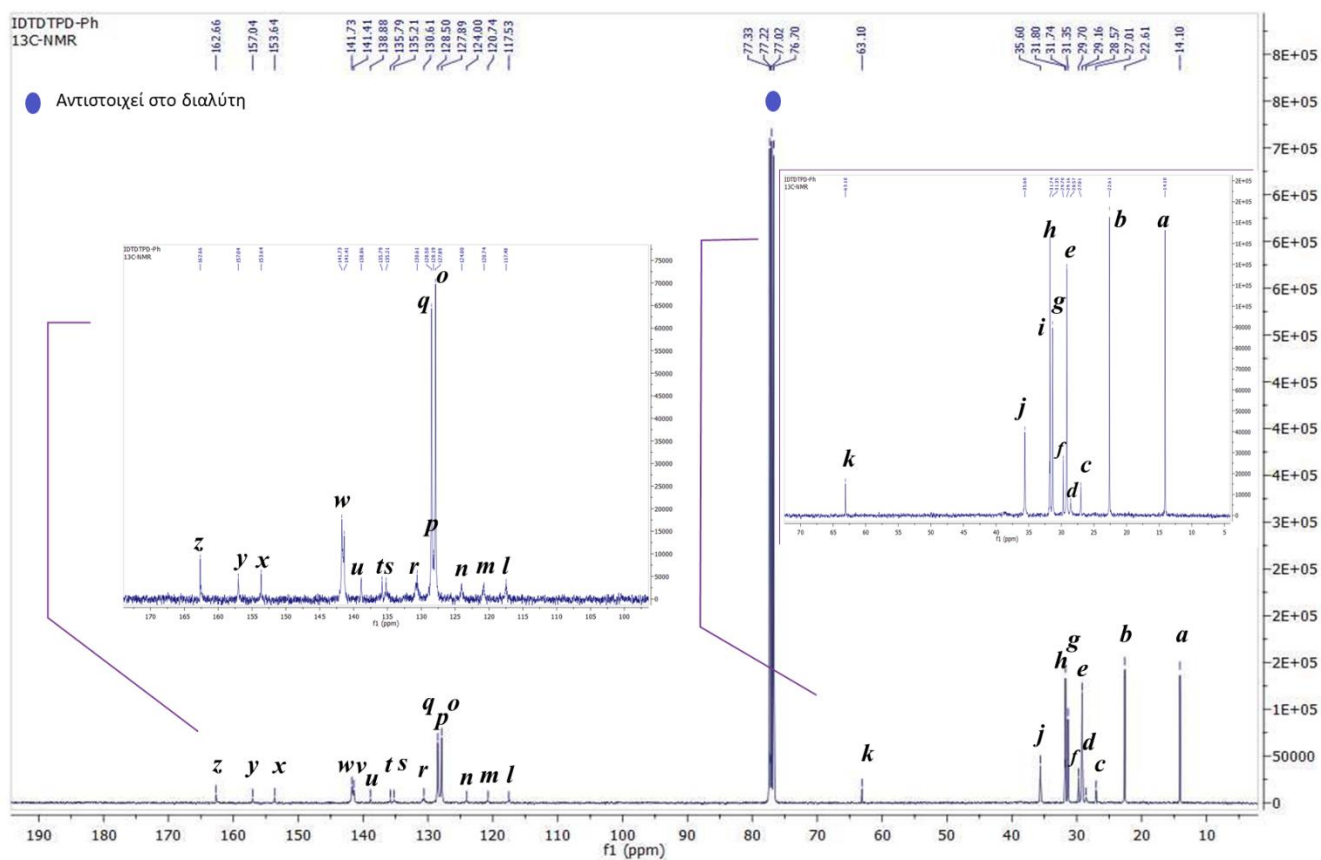
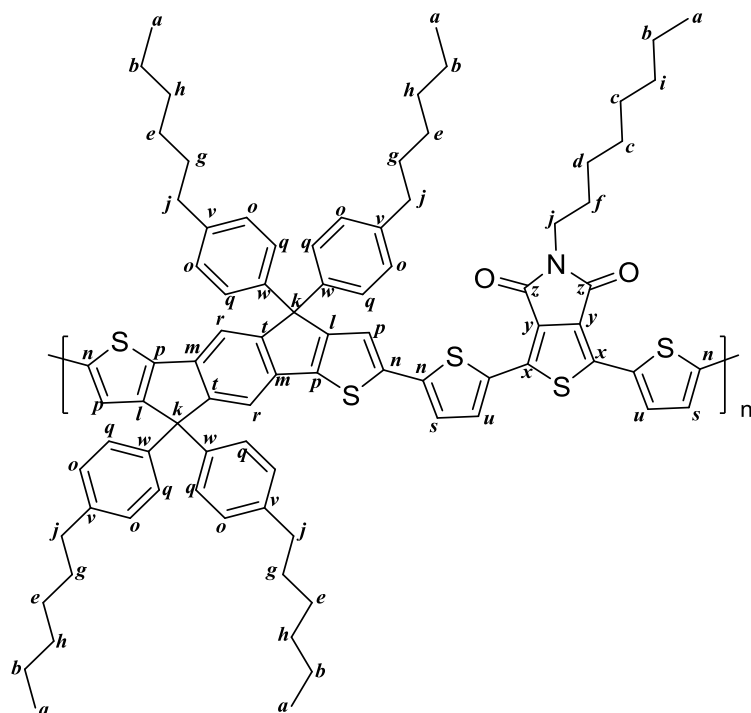
✓ IDTDTPD-Ph ή CP2

Ακολουθεί η παρουσίαση των φασμάτων NMR του CP2 και πρώτα το ^1H -NMR, το οποίο φαίνεται παρακάτω.



Σχήμα 3: Φάσμα ^1H -NMR του CP2.

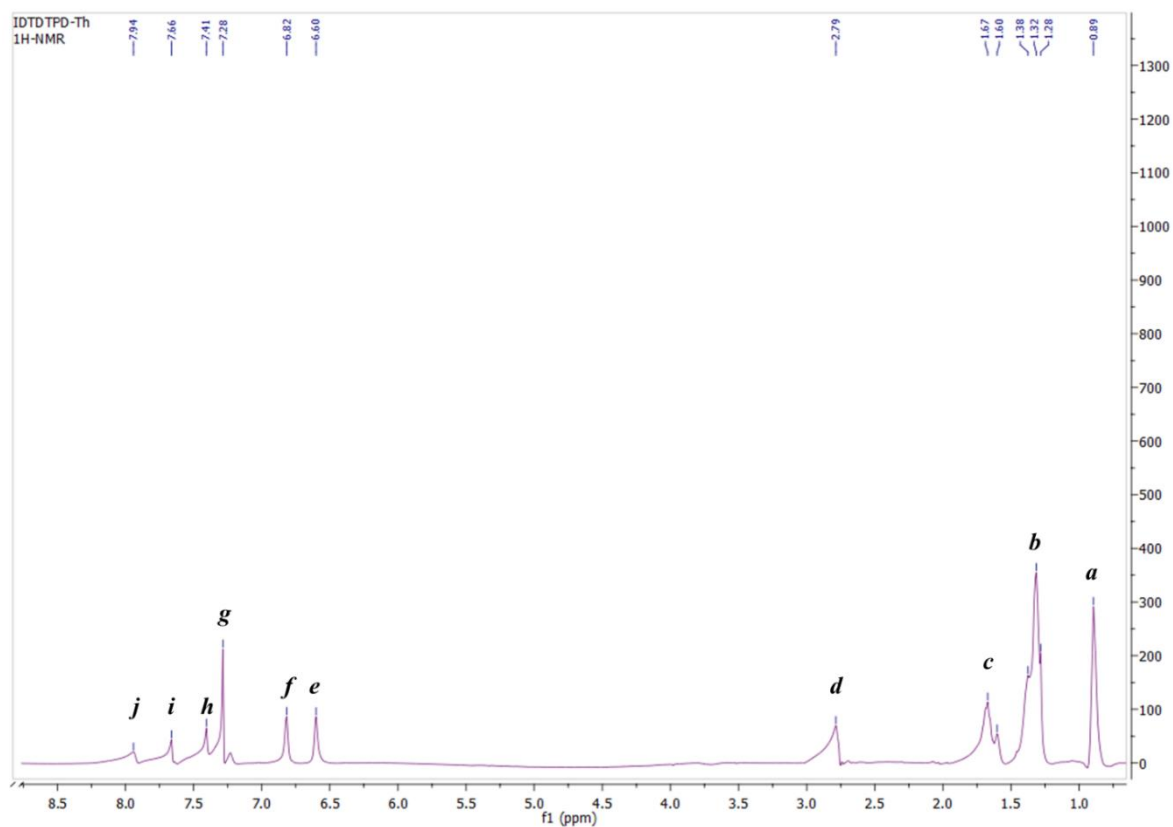
Αντίστοιχα και σε αυτό το πολυμερές φαίνονται τα πρωτόνια των αλειφατικών ομάδων σε υψηλότερο πεδίο, ενώ σε χαμηλότερο πεδίο φαίνονται κάποια αρωματικά πρωτόνια είτε από τα φαινύλια των παράπλευρων ομάδων είτε από φαινύλιο ή θειοφαίνεια της κύριας πολυμερικής αλυσίδας. Το CP2 εμφάνισε καλή διαλυτότητα οπότε δεν αντιμετωπίστηκαν τα προβλήματα που είχε το CP1. Συνεπώς παρατίθεται το φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ παρακάτω.



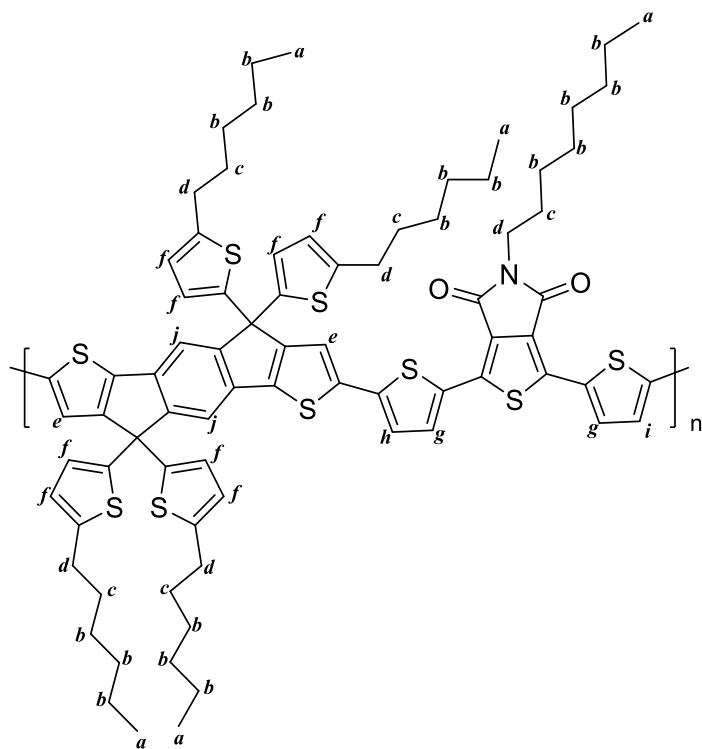
Σχήμα 4: Φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ του CP2.

✓ IDTDPD-Th ή CP3

Τέλος, ακολουθεί η παρουσίαση των φασμάτων NMR του CP3 και ξανά πρώτα παρατίθεται το ^1H -NMR, το οποίο φαίνεται παρακάτω.

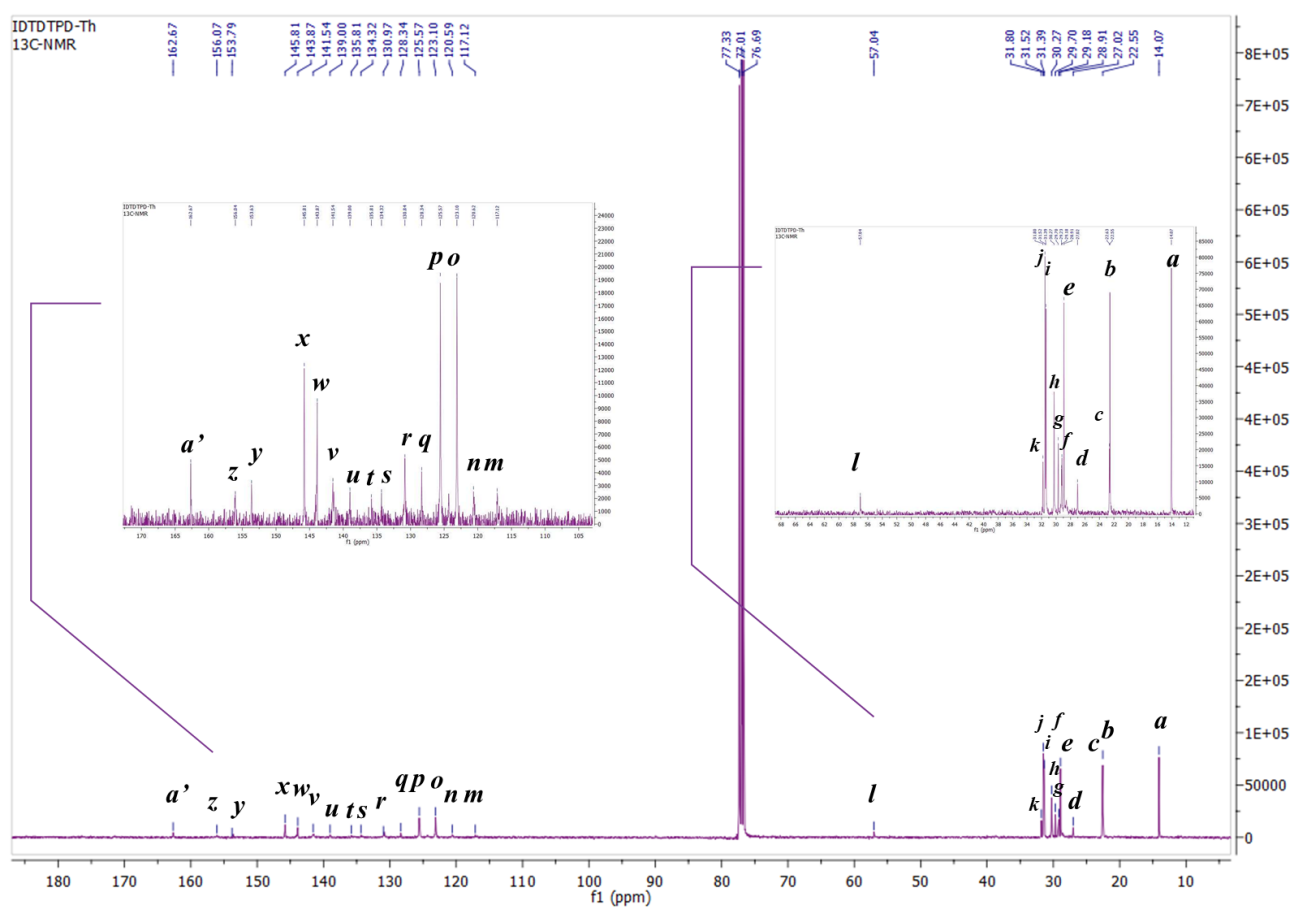
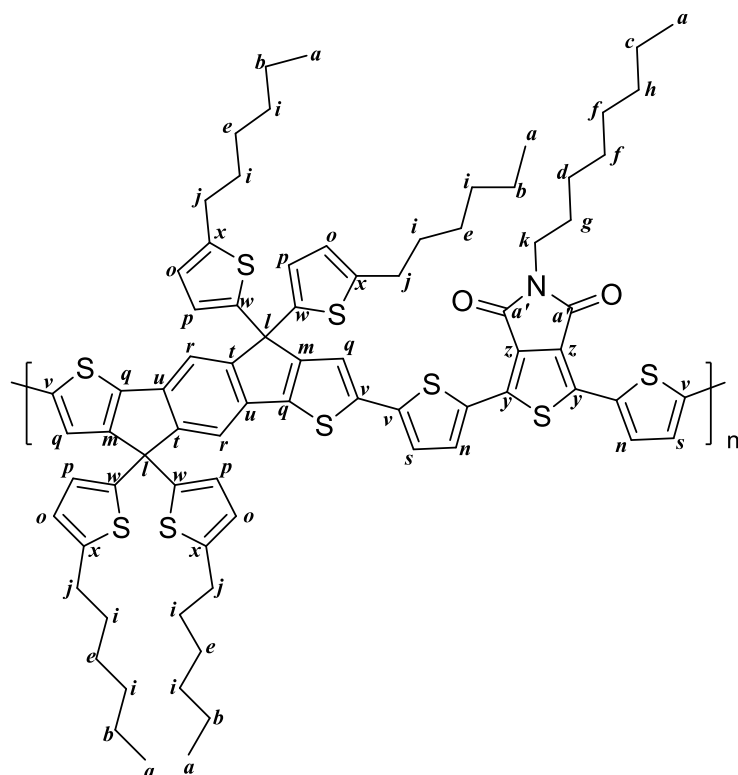


Σχήμα 5: Φάσμα ^1H -NMR του CP3.



Αντίστοιχα και σε αυτό το πολυμερές φαίνονται τα πρωτόνια των αλειφατικών ομάδων σε υψηλότερο πεδίο, ενώ σε χαμηλότερο πεδίο φαίνονται κάποια

αρωματικά πρωτόνια είτε από τα φαινύλια των παράπλευρων ομάδων είτε από φαινύλιο ή θειοφαίνεια της κύριας πολυμερικής αλυσίδας. Το CP3 εμφάνισε, επίσης, καλή διαλυτότητα σαν το CP2. Συνεπώς παρατίθεται το φάσμα ^{13}C -NMR παρακάτω.

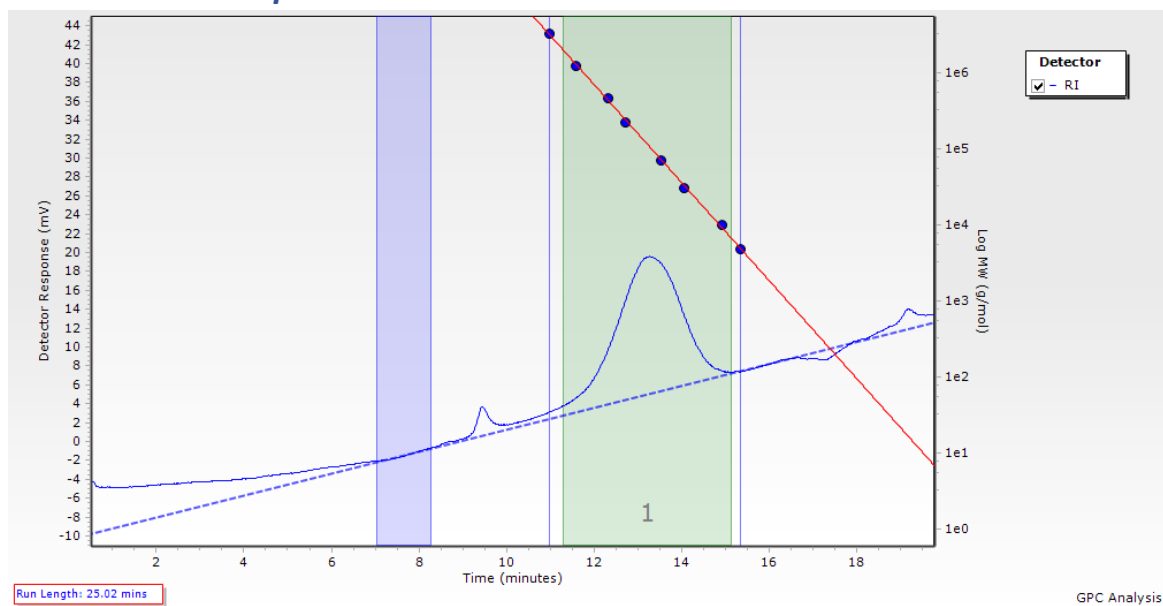


Σχήμα 6: Φάσμα ^{13}C -NMR του CP3.

Και εδώ φαίνονται άνθρακες των αλειφατικών ομάδων σε υψηλότερο πεδίο, ενώ σε χαμηλότερο πεδίο φαίνονται κάποιοι αρωματικοί άνθρακες είτε από τα φαινύλια των παράπλευρων ομάδων είτε από φαινύλιο ή θειοφαίνεια της κύριας πολυμερικής αλυσίδας. Γενικά, πάνω από τα 100ppm βρίσκονται οι άνθρακες που συμμετέχουν περισσότερο στο π-συζυγιακό σύστημα.

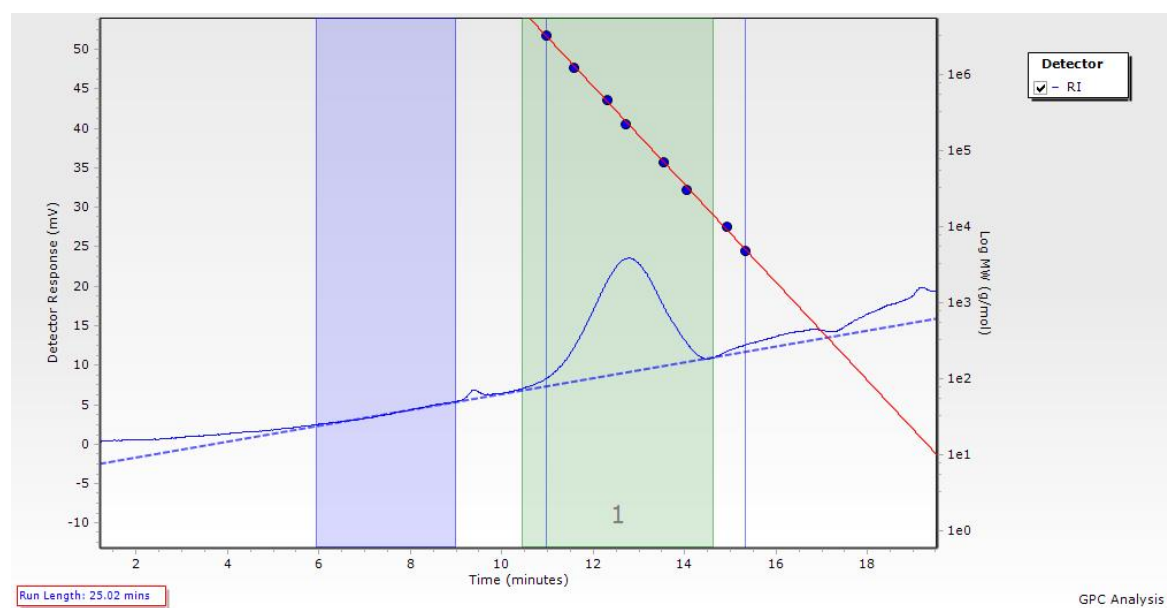
6.1.2.: Φάσματα Χρωματογραφίας Διαχωρισμού μέσω Πηκτής (GPC)

✓ **BTTPD-Th ή CP1**



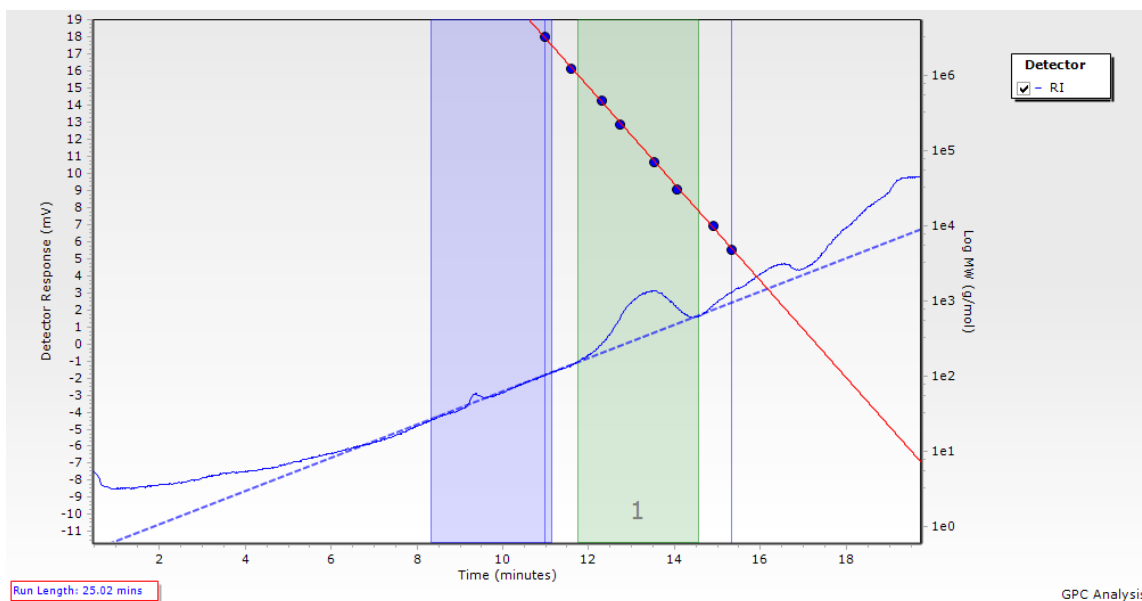
Σχήμα 7: Χρωματογράφημα GPC του CP1.

✓ **IDTDTPD-Ph ή CP2**



Σχήμα 8: Χρωματογράφημα GPC του CP2.

✓ IDTDTPD-Th ή CP



Σχήμα 9: Χρωματογράφημα GPC του CP3.

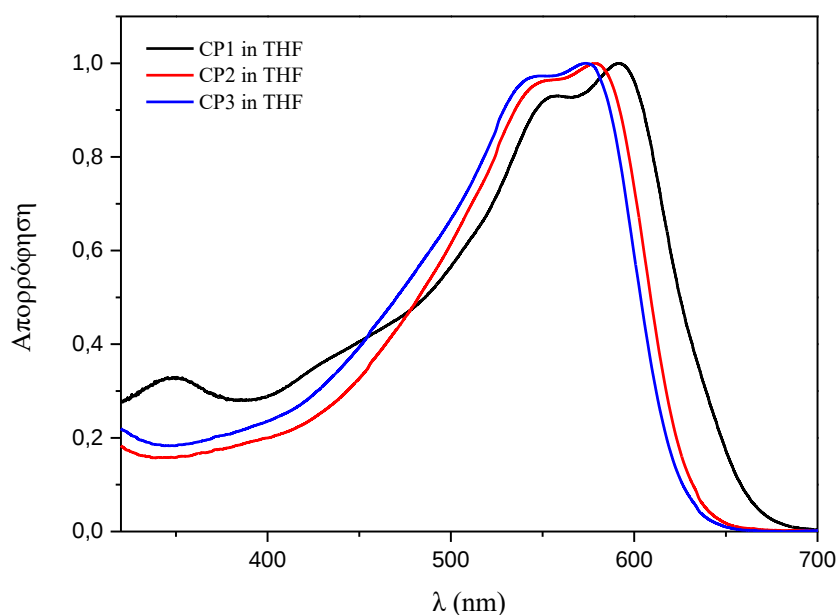
Πολυμερή	Μέσο Μοριακό Βάρος κατ' Αριθμό $[M_n]$	Μέσο Μοριακό Βάρος κατ' Βάρος $[M_w]$	Κατανομή Μοριακών Βαρών ή Πολυδιασπορά [PDI]
BTTPD-Th ή CP1	70500	197100	2.80
IDTDTPD-Ph ή CP2	155700	443600	2.85
IDTDTPD-Th ή CP3	84300	144200	1.71

Πίνακας 2: Αποτελέσματα χαρακτηρισμού GPC για τα συντιθέμενα πολυμερή σε διαλύτη χλωροβενζόλιο (C_6H_5Cl) στους $150^\circ C$.

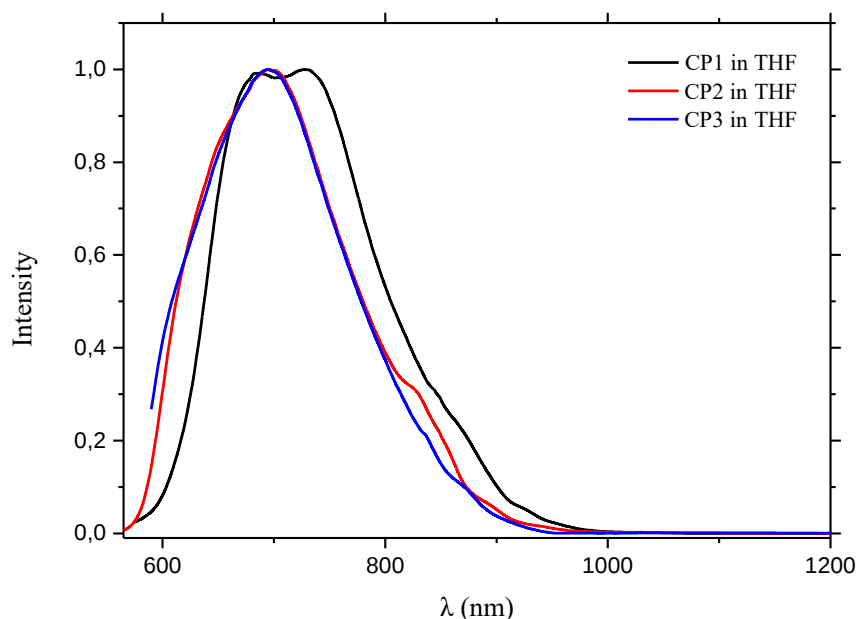
Με βάση τον συγκεντρωτικό πίνακα 2, παρατηρείται ότι το CP2 έχει το μεγαλύτερο μέσο μοριακό βάρος κατά βάρος και κατά αριθμό από τα 3 συντιθέμενα πολυμερή και τη μεγαλύτερη πολυδιασπορά. Τα υπόλοιπα δύο έχουν εξίσου πάρα πολύ καλές τιμές πολυδιασποράς σε σχέση με το μέσο μοριακό βάρος που δόθηκε από τα χρωματογράφημα GPC. Το CP3 ενώ έχει μεγαλύτερο μέσο μοριακό βάρος κατά αριθμό από το CP1, στην περίπτωση του μέσου μοριακού βάρους κατά βάρους ισχύει το αντίθετο.

6.1.3.:Φασματοσκοπία UV-Vis, Φθορισμού & Κβαντικές Αποδόσεις (QY) των συντιθέμενων CPs σε διαλύτη THF

Αρχικά, παρατίθενται τα φάσματα UV-Vis των 3 πολυμερών τα οποία ήταν διαλυμένα σε διαλύτη τετραϋδροφουράνιο (THF) απεσταγμένο και απαλλαγμένο από σταθεροποιητές και σε ξηρές συνθήκες, καθώς και στις ίδιες συνθήκες διαλύτη, αλλά και υπό ατμόσφαιρα αργού μέσω διαβίβασης (bubbling) τα φάσματα εκπομπής και διέγερσης.



Σχήμα 10: Κανονικοποιημένο Φάσμα απορρόφησης UV-Vis των 3 πολυμερών σε διαλύτη THF σε ξηρές συνθήκες.



Σχήμα 11: Κανονικοποιημένο Φάσμα εκπομπής των 3 πολυμερών σε διαλύτη THF υπό ξηρές συνθήκες και υπό ατμόσφαιρα αργού.

Στη συνέχεια παρατίθεται ο πίνακας 3, όπου φαίνονται τα μέγιστα μήκη κύματος για κάθε περίπτωση πολυμερούς από τα φάσματα απορρόφησης και εκπομπής.

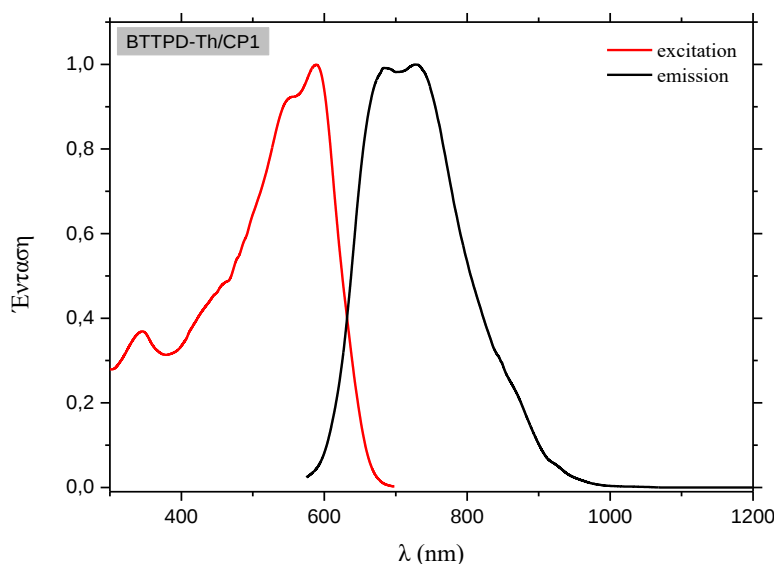
Πολυμερή σε THF	$\lambda_{\max}$ (nm) Απορρόφηση	$\lambda_{\max}$ (nm) Εκπομπή
BTTPD-Th ή CP1	550.0 (ώμος), 590.0.	683.0, 728.0
IDTDPD-Ph ή CP2	545.0 (ώμος), 580.0	697.0
IDTDPD-Th ή CP3	538.0 (ώμος), 570.0	692.0

Πίνακας 3: Μέγιστα μήκη κύματος απορρόφησης και εκπομπής των συντιθέμενων πολυμερών.

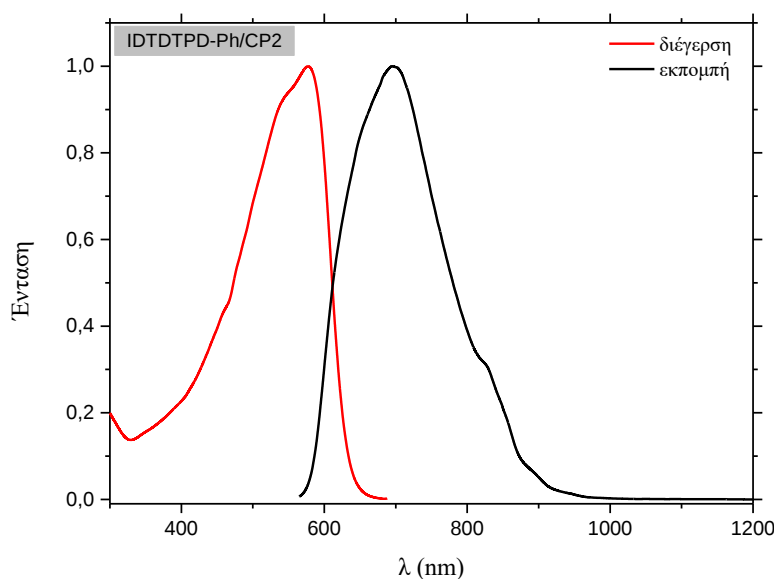
Βλέπουμε λοιπόν, ότι ξεκινώντας από το CP1 προς το CP3 υπάρχει υψοχρωμική (blue shifted) μετατόπιση όσον αφορά τα φάσματα απορρόφησης. Και στα 3 CPs παρατηρείται η παρουσία ώμων υψοχρωμικά του μέγιστου μήκους κύματος. Το προφίλ του φάσματος απορρόφησης είναι σχεδόν ίδιο και για τα 3 CPs και αυτό οφείλεται στο εκτεταμένο π- συζυγιακό σύστημα της διθειοφαινυλοπυρρολοδιόνης (ως η μονάδα δέκτη και στα 3) με το βενζοδιθειοφαίνιο και το ιντακενοδιθειοφαίνιο (ως οι μονάδες δότη στο CP1, CP2, CP3 αντίστοιχα). Οι διαφορές στα μέγιστα μήκη κύματος απορρόφησης των CPs στο διαλύτη THF βρίσκονται στις διαφορές που έχουν ως προς τις δομικές τους μονάδες. Δηλαδή το CP2 με το CP3 που έχουν διαφορετικούς τους υποκαταστάτες στην μονάδα του ιντακενοδιθειοφαινίου (IDT), φαίνεται ότι οι φαινυλ- υποκαταστάτες στην περίπτωση του CP2 οδηγούν σε μεγαλύτερη κατά 10nm βαθυχρωμική μετατόπιση (red shifted) απ' ότι οι θιένυλ- υποκαταστάτες στην περίπτωση του CP3.

Όσον αφορά την εκπομπή των CPs σε διαλύτη THF, παρατηρούμε ότι το CP1 εμφανίζει δύο κορυφές στο φάσμα εκπομπής, ενώ τα άλλα μία. Η μία εκ των δύο

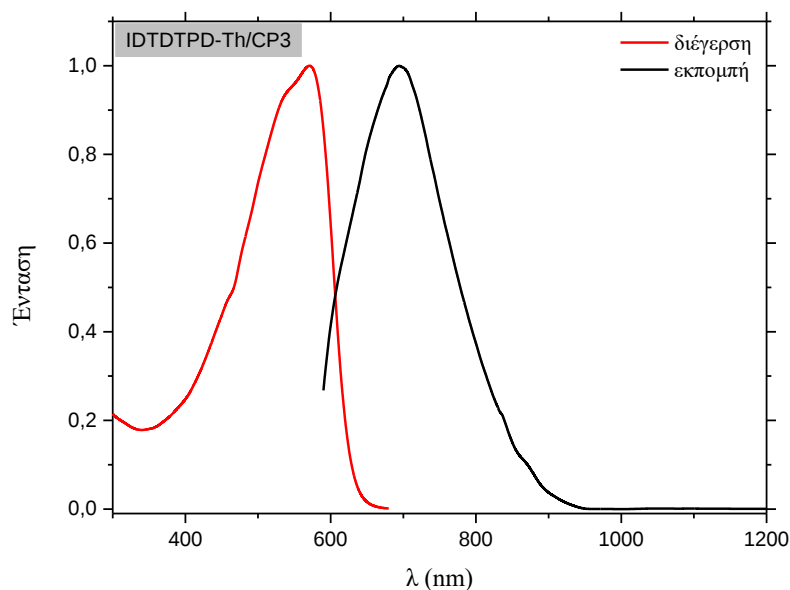
κορυφών εκπομπής στο CP1 βρίσκεται στην περιοχή NIR-I, ενώ η άλλη στην περιοχή του ορατού, όπου οριακά εντοπίζονται και οι κορυφές των CP2 και CP3. Αναλυτικότερα, παρατίθενται ακολούθως και τα διαγράμματα διέγερσης-εκπομπής για κάθε CP ξεχωριστά (Σχήματα 6,7,8) με βάση τα οποία υπολογίζεται το μήκος κύματος τομής των δύο αυτών καμπυλών με το οποίο υπολογίζεται η ενέργεια απλής κατάστασης (εξίσωση E21) και οι κβαντικές αποδόσεις (Πίνακας 4). Οι κβαντικές αποδόσεις (QY) υπολογίστηκαν όπως περιεγράφηκαν στα κεφάλαια 4.4 & 5.5 και οι τιμές που βρέθηκαν για τα πολυμερή στο «καλό» τους διαλύτη (THF) φαίνονται στον πίνακα 4, όπου υπολογίστηκαν με βάση την εξίσωση E18.



Σχήμα 12: Κανονικοποιημένο Φάσμα διέγερσης και εκπομπής του CP1 (BTTPD-Th) σε διαλύτη THF υπό ξηρές συνθήκες και υπό ατμόσφαιρα αργού.



Σχήμα 13: Κανονικοποιημένο Φάσμα διέγερσης και εκπομπής του CP2 (IDTDTPD-Ph) σε διαλύτη THF υπό ξηρές συνθήκες και υπό ατμόσφαιρα αργού.



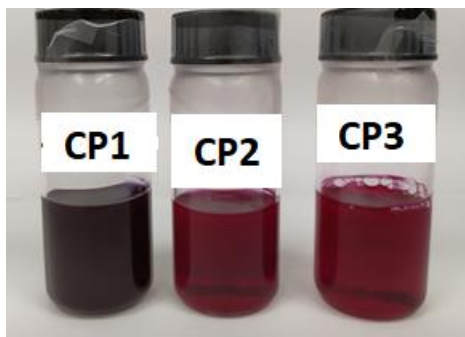
Βλέποντας τον πίνακα 4, βλέπουμε ότι η κβαντική απόδοση του CP3 σε διαλύτη THF είναι μεγαλύτερη από τα 3, με τιμή περίπου 43% ενώ το CP2 έχει 36% και το CP1 έχει

Σχήμα 14: Κανονικοποιημένο Φάσμα διέγερσης και εκπομπής του CP3 (IDTDTPD-Th) σε διαλύτη THF υπό ξηρές συνθήκες και υπό ατμόσφαιρα αργού.

Πολυμερή σε THF	Ενέργεια Απλής Κατάστασης (kcal/mol)	Μέσος όρος QY	Τυπική απόκλιση της QY
BTTPD-Th/CP1	45,0	0,319	0,016
IDTDTPD-Ph/CP2	46,7	0,363	0,003
IDTDTPD-Th/CP3	47,2	0,427	0,014

Πίνακας 4: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων από φασματοσκοπία φθορισμού για τα CPs σε THF.

Τελικώς, ακολουθεί φωτογραφία των συντιθέμενων CPs σε διαλύτη THF συγκέντρωσης 20ppm.

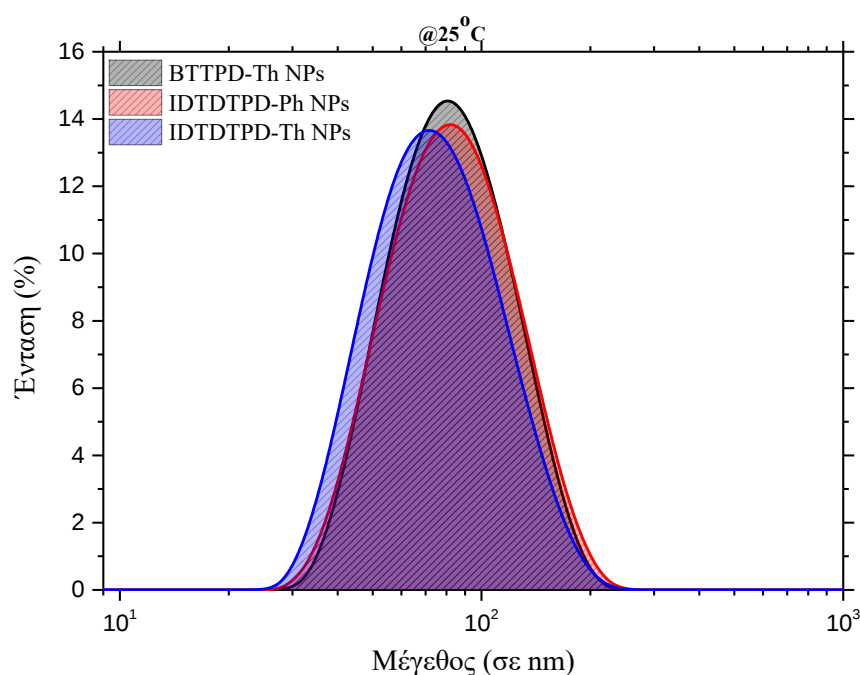


Εικόνα 41: Τα υπό μελέτη CPs διαλυμένα σε THF.

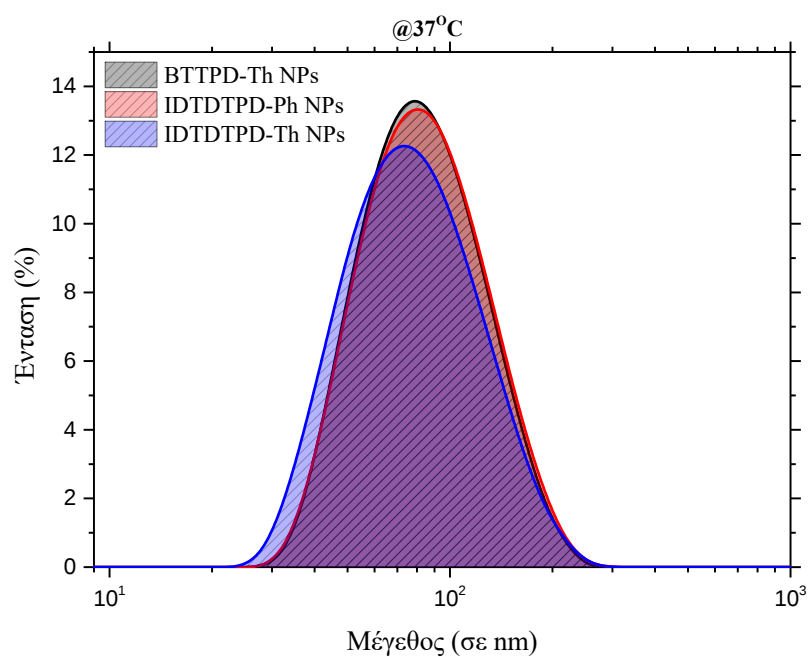
6.2.: Χαρακτηρισμός των nanoprecipitated CPNs

6.2.1.:DLS & zeta potential κάποιων παρτίδων των nanoprecipitated CPNs

Συνολικά φτιάχτηκαν 12 παρτίδες (batches) για το κάθε πολυμερές με τη μορφή νανοσωματιδίων στο νερό με μέθοδο σύνθεσης την καταβύθιση (nanoprecipitation), τα οποία καλούνται nanoprecipitated. Αρχικά πρέπει να σημειωθεί ότι τα πολυμερή αυτά που είναι υδρόφοβα, κατάφεραν να διαλυθούν σε νερό και έτσι να δοκιμαστούν σε βιολογικές εφαρμογές. Παρακάτω παρατίθενται για κάθε παρτίδα το μέγεθος των νανοσωματιδίων καθώς και το zeta δυναμικό σε θερμοκρασία 25 και 37°C (εκτός από την παρτίδα 1 όπου έχουμε μόνο στους 25°C) με μορφή διαγραμμάτων του μεγέθους συναρτήσει της έντασης % και σε πίνακες τα αναλυτικά αποτελέσματα σε μέσους όρους $\pm$ τυπική απόκλιση για τις παραμέτρους Z-Ave, πολυδιασπορά ή PDI, PK1mean και zeta potential. Σε αυτό το κεφάλαιο θα αναρτηθούν ενδεικτικά κάποια από τα διαγράμματα αυτά με τους αντίστοιχους πίνακες μερικών παρτίδων. Συγκεκριμένα, οι παρτίδες 9 και 11, οι οποίες έχουν χρησιμοποιηθεί για κάποια από τα βιολογικά πειράματα, αλλά και η παρτίδα 10 στην οποία έγιναν εβδομαδιαίες μετρήσεις μεγέθους και δυναμικού ζ, αναρτούνται παρακάτω με τη σειρά που αναφέρθηκαν. Τα διαγράμματα και πίνακες των υπόλοιπων παρτίδων αναφέρονται στο Παράρτημα 2.



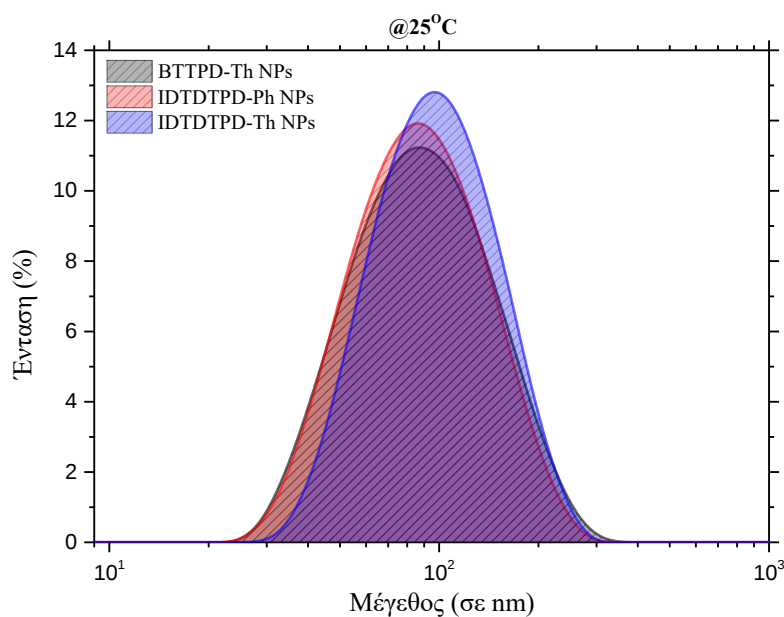
Σχήμα 15: Διάγραμμα δυναμικής σκέδασης φωτός, όπου αποδίδεται το ποσοστό των σκεδαζόμενων σωματιδίων συναρτήσει της έντασης της παρτίδας 9 των NPs στους 25°C



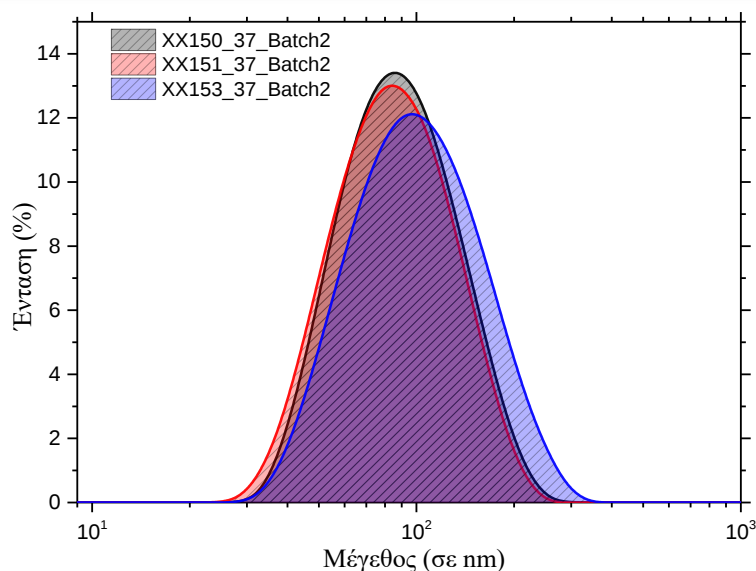
Σχήμα 16: Διάγραμμα δυναμικής σκέδασης φωτός, όπου αποδίδεται το ποσοστό των σκεδαζόμενων σωματιδίων συναρτήσει της έντασης της παρτίδας 9 των NPs στους 37°C.

Δείγματα	DLS (25°C)			DLS (37°C)				
	Z-Ave (nm)	PDI	PK1 mean (nm)	Z-Ave (nm)	PDI	PK1 mean (nm)	Z potential	Std dev
BTPD-Th	76,56 ± 0,28	0,122 ± 0,005	87,82 ± 0,66	77,72 ± 0,49	0,137 ± 0,002	88,99 ± 0,82	-25,2	10,1
IDTDPD-Ph	75,83 ± 0,4	0,116 ± 0,007	86,03 ± 1,08	77,16 ± 0,34	0,133 ± 0,004	89,38 ± 0,45	-23,2	8,96
IDTDPD-Th	69,15 ± 0,17	0,151 ± 0,009	74,73 ± 6,69	71,82 ± 0,84	0,182 ± 0,022	84,54 ± 0,98	-23,9	12,4

Πίνακας 5: Αποτελέσματα μετρήσεων DLS & δυναμικού zeta της παρτίδας 9 των NPs στους 25 και 37°C.



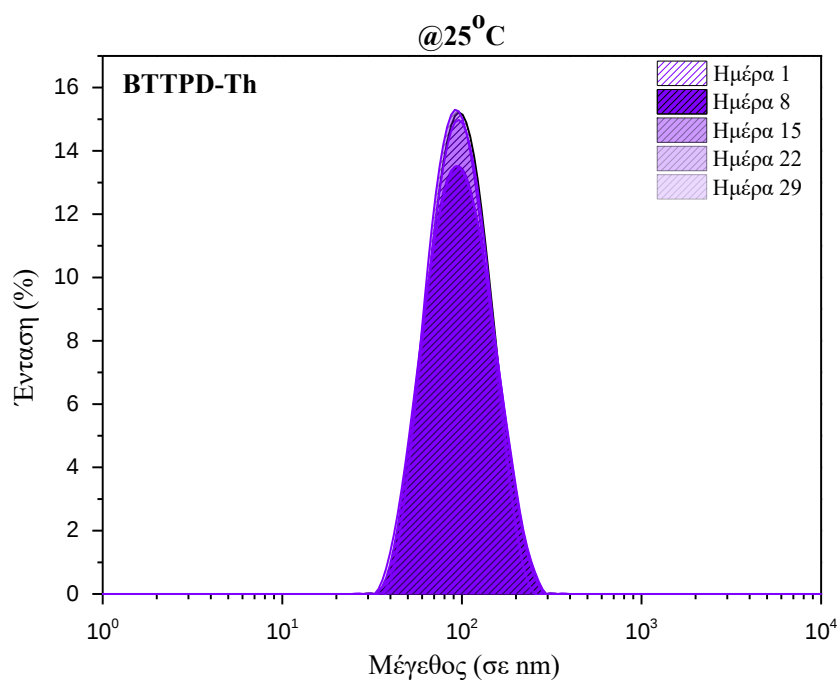
Σχήμα 17: Διάγραμμα δυναμικής σκέδασης φωτός, όπου αποδίδεται το ποσοστό των σκεδαζόμενων σωματιδίων συναρτήσει της έντασης της παρτίδας 11 των NPs στους 25°C.



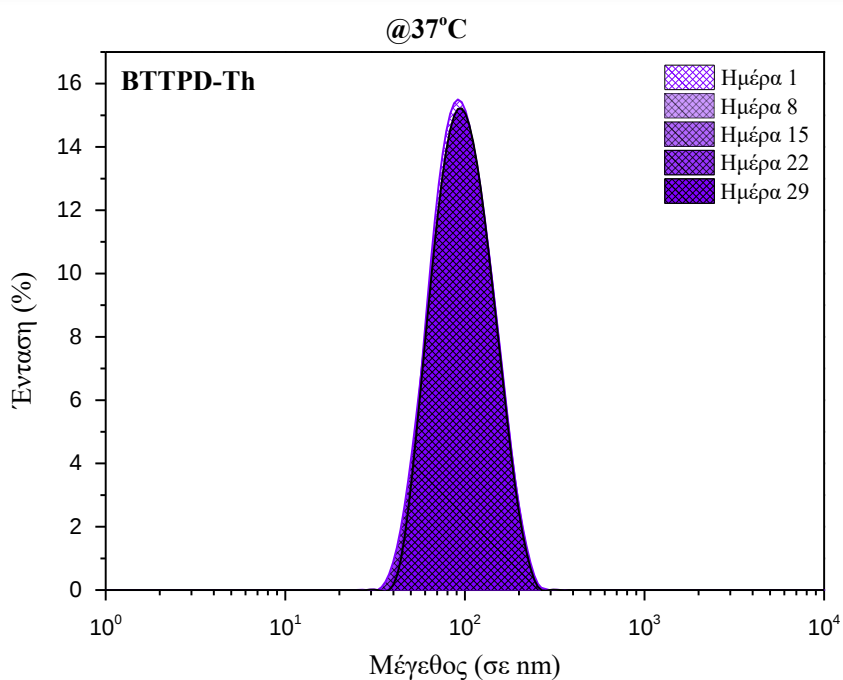
Σχήμα 18: Διάγραμμα δυναμικής σκέδασης φωτός, όπου αποδίδεται το ποσοστό των σκεδαζόμενων σωματιδίων συναρτήσει της έντασης της παρτίδας 11 των NPs στους 37°C

Δείγματα	DLS (25°C)			DLS (37°C)				
	Z-Ave (nm)	PDI	PK1 mean (nm)	Z-Ave (nm)	PDI	PK1 mean (nm)	Z potential	Std dev
BTPD-Th	79,96 ± 0,18	0,165 ± 0,006	93,81 ± 2,14	80,41 ± 0,15	0,15 ± 0,006	93,04 ± 1,89	-48,2	10,5
IDTDTPD-Ph	81,14 ± 0,098	0,189 ± 0,009	96,92 ± 1,57	81,74 ± 0,09	0,2 ± 0,002	92,44 ± 0,54	-46,8	18,7
IDTDTPD-Th	88,65 ± 0,19	0,143 ± 0,004	104,93 ± 0,9	90,6 ± 0,62	0,16 ± 0,013	104,37 ± 3,14	-40,1	5,77

Πίνακας 6: Αποτελέσματα μετρήσεων DLS & δυναμικού zeta της παρτίδας 11 των NPs στους 25 και 37°C



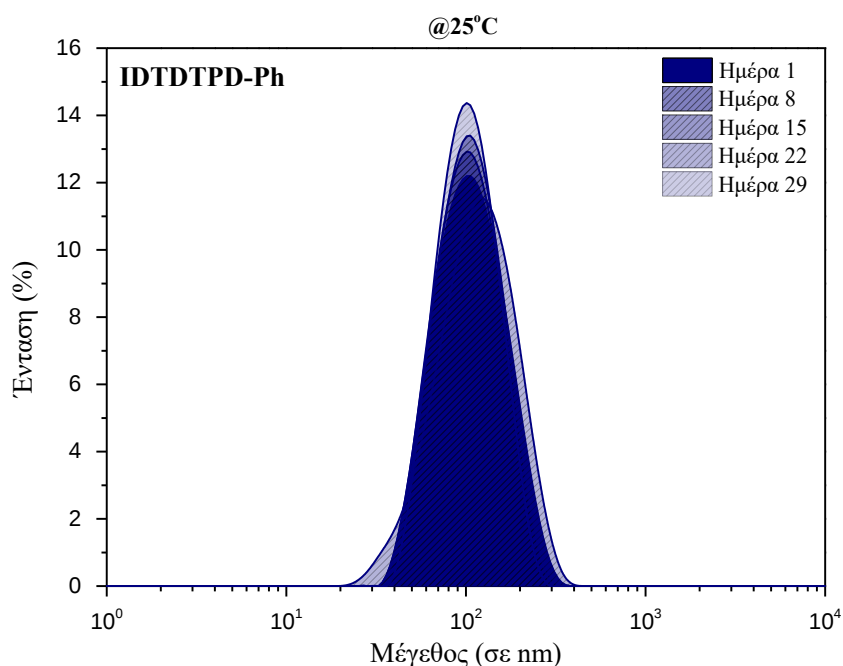
Σχήμα 19: Διάγραμμα δυναμικής σκέδασης φωτός, όπου αποδίδεται το ποσοστό των σκεδαζόμενων σωματιδίων συναρτήσει της έντασης εβδομαδιαίων μετρήσεων της παρτίδας 10 των BTPD-Th nanoprecipitated NPs στους 25°C.



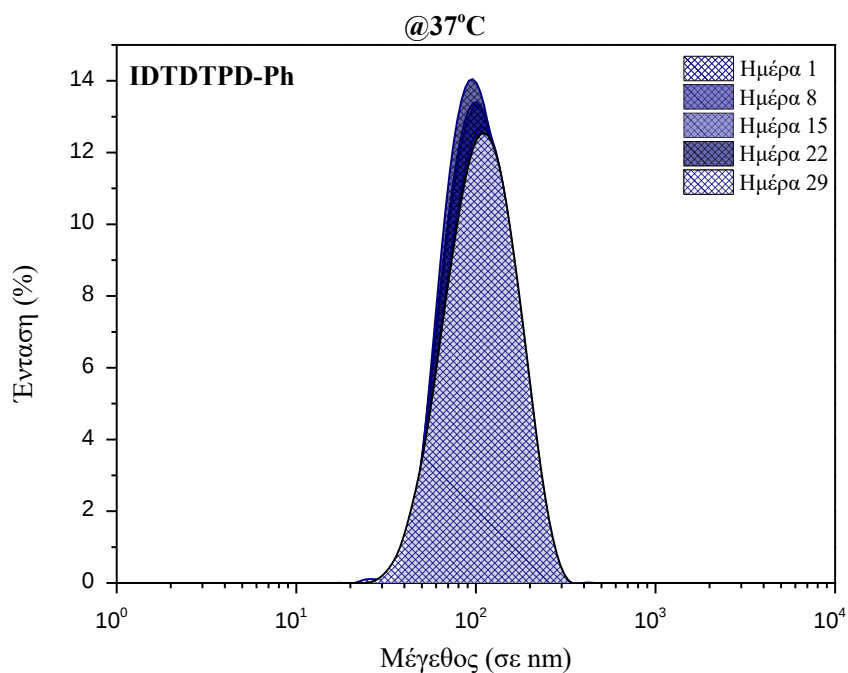
Σχήμα 20: Διάγραμμα δυναμικής σκέδασης φωτός, όπου αποδίδεται το ποσοστό των σκεδαζόμενων σωματιδίων συναρτήσει της έντασης εβδομαδιαίων μετρήσεων της παρτίδας 10 των BTPD-Th nanoprecipitated NPs στους 37°C

BTTPD-Th	DLS (25°C)			DLS (37°C)				
	Z-Ave (nm)	PDI	PK1 mean (nm)	Z-Ave (nm)	PDI	PK1 mean (nm)	Z potential	Std dev
Ημέρα 1	90,92 ± 0,07	0,106 ± 0,001	103,13 ± 0,033	90,98 ± 0,17	0,115 ± 0,01	103,13 ± 1,04	-26,5	16,2
Ημέρα 8	90,89 ± 0,21	0,139 ± 0,014	106 ± 1,98	91,89 ± 0,1	0,117 ± 0,003	104,93 ± 0,6	-24,4	31,2
Ημέρα 15	89,91 ± 0,35	0,104 ± 0,003	101,57 ± 0,43	91,23 ± 0,21	0,121 ± 0,009	104,77 ± 1,58	-18,8	21,4
Ημέρα 22	89,52 ± 0,16	0,116 ± 0,009	0,116 ± 0,009	90,52 ± 0,32	0,118 ± 0,005	103,63 ± 0,5	-25,9	22,1
Ημέρα 29	89,00 ± 0,05	0,125 ± 0,010	103,27 ± 1,13	91,24 ± 0,39	0,108 ± 0,003	103,1 ± 0,3	-23,4	15,3

Πίνακας 7: Αποτελέσματα μετρήσεων DLS & δυναμικού zeta της παρτίδας 11 των BTTPD-Th nanoprecipitated NPs στους 25 και 37°C



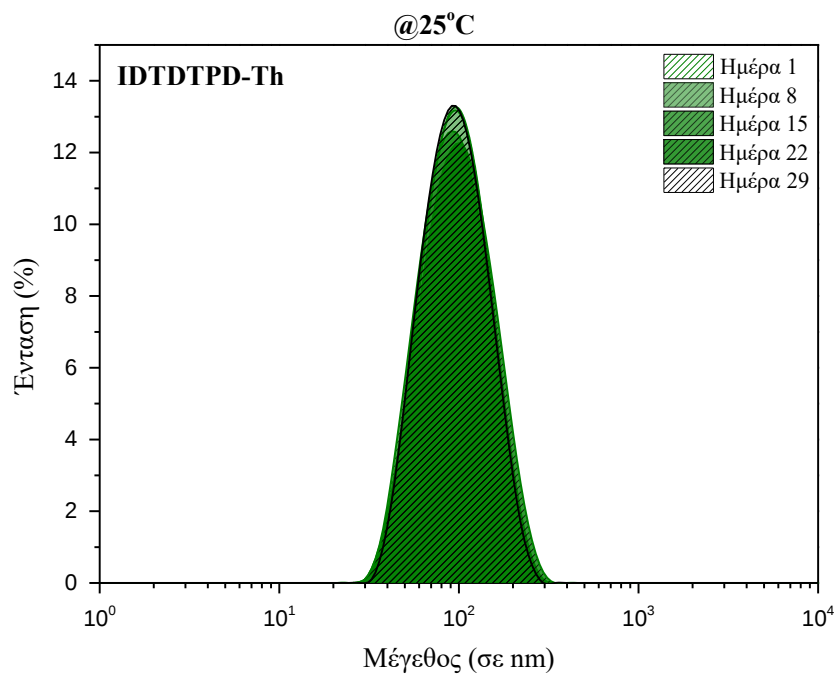
Σχήμα 21: Διάγραμμα δυναμικής σκέδασης φωτός, όπου αποδίδεται το ποσοστό των σκεδαζόμενων σωματιδίων συναρτήσει της έντασης εβδομαδιαίων μετρήσεων της παρτίδας 10 των IDTDTPD-Ph nanoprecipitated NPs στους 25°C.



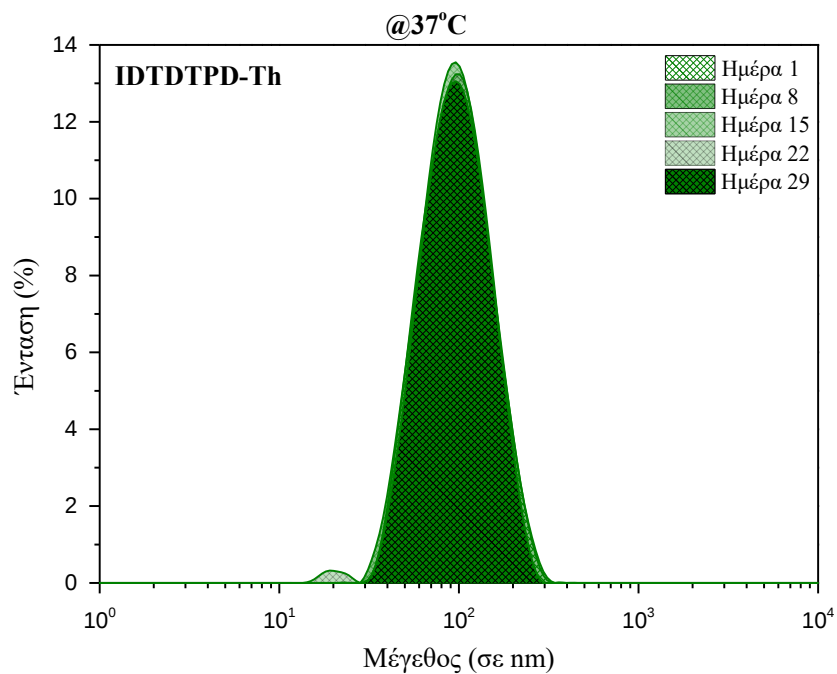
Σχήμα 22: Διάγραμμα δυναμικής σκέδασης φωτός, όπου αποδίδεται το ποσοστό των σκεδαζόμενων σωματιδίων συναρτήσει της έντασης εβδομαδιαίων μετρήσεων της παρτίδας 10 των IDTDTPD-Ph nanoprecipitated NPs στους 37°C

IDTDTPD-Ph	DLS (25°C)			DLS (37°C)				
	Z-Ave (nm)	PDI	PK1 mean (nm)	Z-Ave (nm)	PDI	PK1 mean (nm)	Z potential	Std dev
Ημέρα 1	96,06 ± 0,58	0,146 ± 0,005	114,03 ± 1,67	97,14 ± 0,52	0,141 ± 0,005	113,77 ± 1,2	-34	8,34
Ημέρα 8	94,48 ± 0,12	0,149 ± 0,01	113,13 ± 1,6	96,14 ± 0,17	0,133 ± 0,004	112,6 ± 0,85	-28,5	5,07
Ημέρα 15	112,6 ± 0,85	0,143 ± 0,006	110,9 ± 0,47	95,35 ± 0,53	0,133 ± 0,003	111,67 ± 0,47	-27,3	8,03
Ημέρα 22	100,6 ± 0,21	0,186 ± 0,002	126,13 ± 0,45	94,77 ± 0,41	0,147 ± 0,001	110,5 ± 1,65	-28,2	7,3
Ημέρα 29	93,73 ± 0,33	0,125 ± 0,003	108,30 ± 0,06	96,19 ± 0,55	0,152 ± 0,005	114,6 ± 0,8	-26,6	6,7

Πίνακας 8: Αποτελέσματα μετρήσεων DLS & δυναμικού zeta της παρτίδας 11 των IDTDTPD-Ph nanoprecipitated NPs στους 25 και 37°C.



Σχήμα 23: Διάγραμμα δυναμικής σκέδασης φωτός, όπου αποδίδεται το ποσοστό των σκεδαζόμενων σωματιδίων συναρτήσει της έντασης εβδομαδιαίων μετρήσεων της παρτίδας 10 των IDTDTPD-Th nanoprecipitated NPs στους 25°C.



Σχήμα 24: Διάγραμμα δυναμικής σκέδασης φωτός, όπου αποδίδεται το ποσοστό των σκεδαζόμενων σωματιδίων συναρτήσει της έντασης εβδομαδιαίων μετρήσεων της παρτίδας 10 των IDTDTPD-Th nanoprecipitated NPs στους 37°C.

IDTDTDPD-Th	DLS (25°C)			DLS (37°C)				
	<i>Z-Ave (nm)</i>	<i>PDI</i>	<i>PK1 mean (nm)</i>	<i>Z-Ave (nm)</i>	<i>PDI</i>	<i>PK1 mean (nm)</i>	Z potential	Std dev
Ημέρα 1	86,46 ± 0,12	0,145 ± 0,007	102,7 ± 0,95	87,64 ± 0,26	0,156 ± 0,003	105,4 ± 0,23	-25,7	41,8
Ημέρα 8	86,77 ± 0,15	0,137 ± 0,004	102,2 ± 0,4	87,1 ± 0,11	0,152 ± 0,001	104,57 ± 0,12	-24,6	16,2
Ημέρα 15	86,10 ± 0,52	0,141 ± 0,012	101,76 ± 1,08	86,69 ± 0,15	0,142 ± 0,003	102,43 ± 0,15	-27,1	28,2
Ημέρα 22	88,2 ± 0,11	0,163 ± 0,005	107,13 ± 0,63	87,41 ± 0,08	0,144 ± 0,004	103,4 ± 0,51	-30,3	38,7
Ημέρα 29	85,59 ± 0,49	0,140 ± 0,002	101,07 ± 0,65	86,26 ± 0,30	0,149 ± 0,006	102,8 ± 1,11	-26,5	21,8

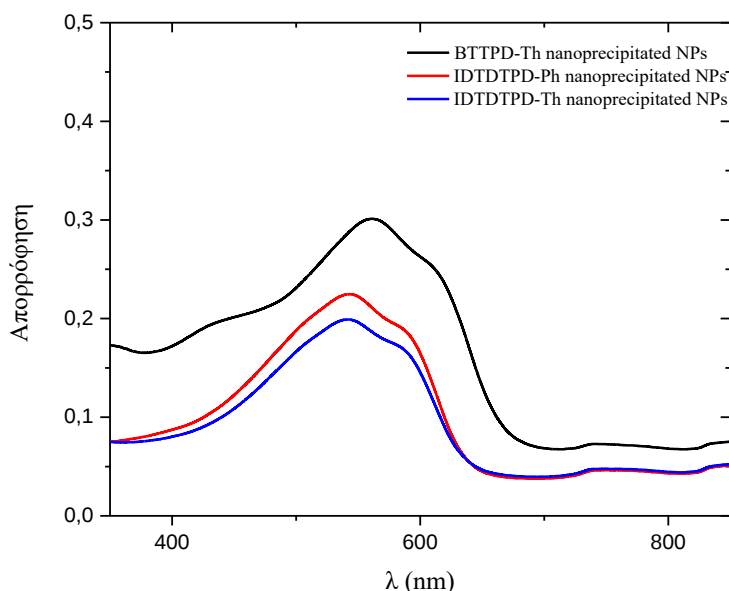
Πίνακας 9: Αποτελέσματα μετρήσεων DLS & δυναμικού zeta της παρτίδας 11 των IDTDTDPD-Th nanoprecipitated NPs στους 25 και 37°C.

Με βάση τα παραπάνω, βλέπουμε ότι τα μεγέθη (Z-Ave), που προκύπτουν με την διαδικασία της νανοκαταβύθισης για κάθε πολυμερές, κυμαίνονται από 70-130 nm και η πολυδιασπορά τους φαίνεται να είναι πολύ καλή και σε τιμές 0,1-0,2. Επιπλέον, υπάρχουν σε κάθε παρτίδα μόνο 1 πληθυσμός, το οποίο εν μέρει επιτυγχάνεται και από το φιλτράρισμα με φίλτρο 0,2μm. Τα νανοσωματίδια αυτά και των 3 πολυμερών μένουν σταθερά στο μέγεθος και στην πολυδιασπορά μέχρι και ύστερα από 29 μέρες από την ημέρα παρασκευής τους. Οι παρατηρήσεις αυτές ισχύουν και για τις δύο θερμοκρασίες στις οποίες έγιναν οι μετρήσεις.

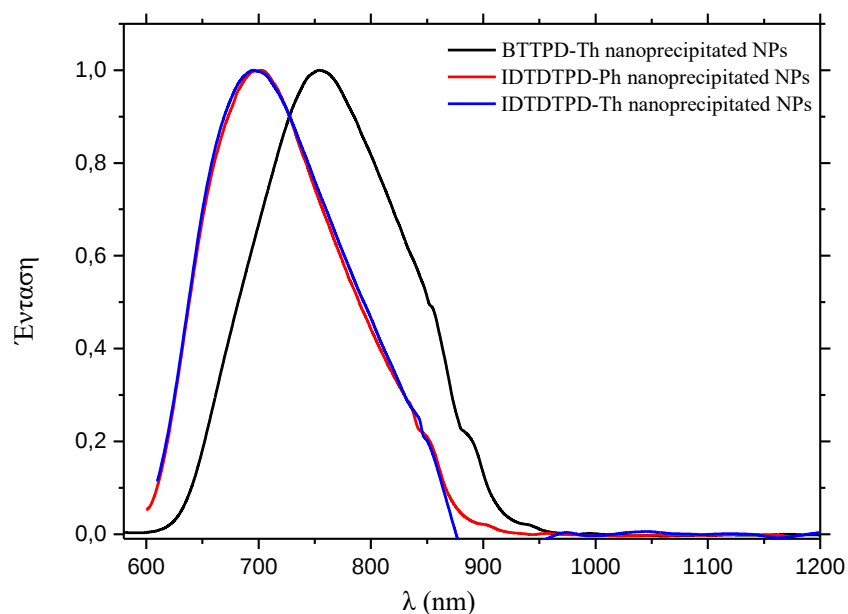
Όσον αφορά το δυναμικό ζ, παρατηρήθηκε ότι κυμαίνονται και για τις 3 περιπτώσεις από περίπου -20 έως -48 με τυπικές αποκλίσεις από περίπου 5-42. Σε κάποιες παρτίδες οι τυπικές αποκλίσεις ήταν μικρές από 5-10 στην περίπτωση δυναμικού -20 έως -40. Παρ' όλα αυτά σε κάποιες παρτίδες η τυπική απόκλιση έβγαине είτε μεγαλύτερη είτε σχεδόν ίση με την τιμή του δυναμικού ζ. Συνεπώς, δεν μπορούν να υπάρξουν ακριβή συμπεράσματα όσον αφορά το δυναμικό ζ.

6.2.2.:Φασματοσκοπία UV-Vis, Φθορισμού & Κβαντικές Αποδόσεις (QY) των νανοκαταβυθιζόμενων NPs

Σε αυτό το κεφάλαιο παρατίθενται τα φάσματα UV-Vis και φθορισμού των 3 CPs με την μορφή νανοσωματιδίων και μέθοδο σύνθεσης την νανοκαταβύθιση. Τα νανοσωματίδια αυτά θα αναφέρονται ως nanoprecipitated NPs



Σχήμα 25: Φάσμα απορρόφησης UV-Vis των 3 CPs σε διαλύτη νερό (δισαπεσταγμένο) με την μορφή nanoprecipitated NPs.



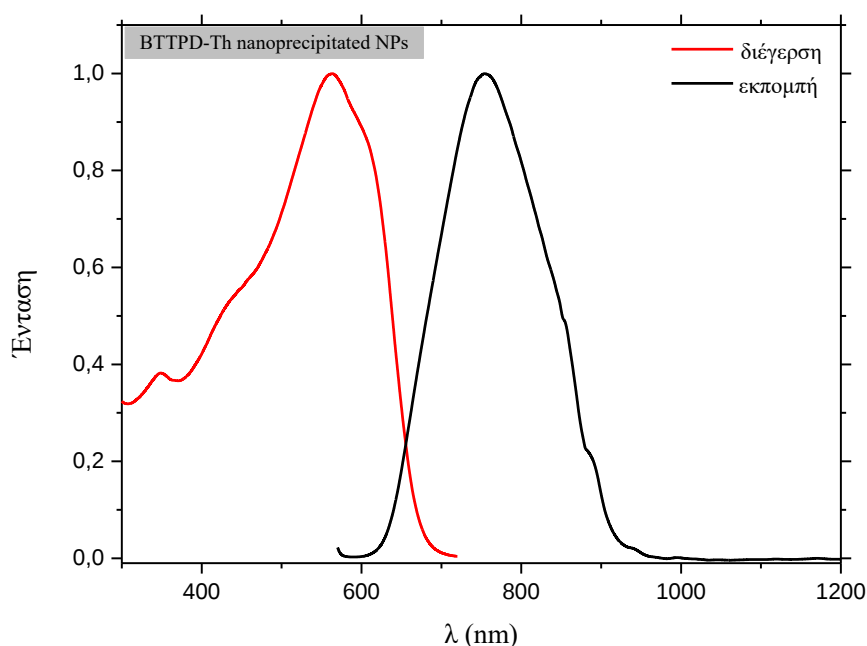
Σχήμα 26: Κανονικοποιημένο φάσμα εκπομπής των 3 CPs σε διαλύτη νερό (δισαπεσταγμένο) με την μορφή nanoprecipitated NPs.

Πολυμερή σε μορφή nanoprecipitated NPs	$\lambda_{\max}$ (nm) Απορρόφηση	$\lambda_{\max}$ (nm) Εκπομπή
BTTPD-Th/CPN1	560.0, 610.0 (ώμος)	754.0
IDTDPD-PH/CPN2	544.0, 590.0 (ώμος)	695.0
IDTDPD-Th/CPN3	540.0., 588.0 (ώμος)	691.0

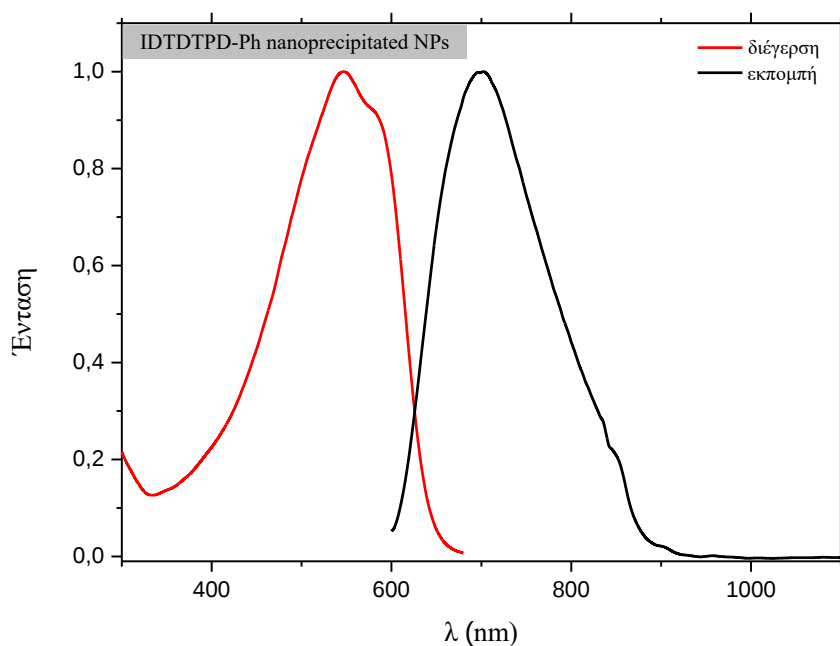
Πίνακας 10: Μέγιστα μήκη κύματος απορρόφησης και εκπομπής των συντιθέμενων CPs με μορφή NPs μέσω νανοκαταβύθισης.

Στην περίπτωση των ίδιων συντιθέμενων CPs, όταν αυτά διαλυθούν σε διαλύτη νερό με μορφή NPs μέσω νανοκαταβύθισης τότε σε σχέση με τα CPs σε THF, παρατηρείται ότι διατηρείται η υψοχρωμική μετατόπιση από το CPN1 προς το CPN3. Υπάρχουν πάλι ώμοι στο φάσμα απορρόφησης και για τα 3, αλλά με τη διαφορά από τα CPs στο THF ότι αυτή τη φορά βρίσκονται βαθυχρωμικά από το μέγιστο μήκος κύματος. Επιπλέον, στην περίπτωση του CPN2 και CPN3 οι διαφορές στο μέγιστο μήκος κύματος είναι πιο μικρή (~4nm) όταν αυτά βρίσκονται υπό μορφή νανοσωματιδίων.

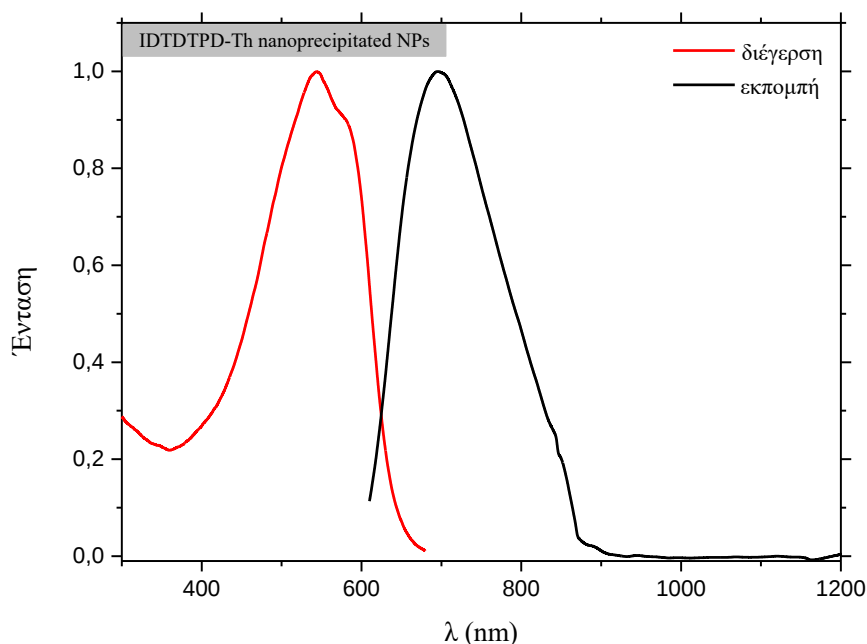
Όσον αφορά την εκπομπή των CPs σε διαλύτη THF, παρατηρούμε ότι το CPN1 εμφανίζει μία κορυφή στο φάσμα εκπομπής, ενώ σε διαλύτη THF εμφάνιζε δύο. Η κορυφή αυτή εκπομπής στο CPN1 βρίσκεται στην περιοχή NIR-I, ενώ των CPN2 και CPN3 βρίσκονται στην περιοχή του ορατού πλησιάζοντας οριακά την περιοχή NIR-I. Αναλυτικότερα, παρατίθενται ακολούθως και τα διαγράμματα διέγερσης-εκπομπής για κάθε CP με μορφή NPs μέσω νανοκαταβύθισης ξεχωριστά (Σχήματα 21,22,23) με βάση τα οποία υπολογίζεται το μήκος κύματος τομής των δύο αυτών καμπυλών με το οποίο υπολογίζεται η ενέργεια απλής κατάστασης (Εξίσωση E21) και οι κβαντικές αποδόσεις (Πίνακας 11). Οι κβαντικές αποδόσεις (QY) υπολογίστηκαν όπως περιεγράφηκαν στα κεφάλαια 4.4 & 5.5 και οι τιμές που βρέθηκαν για τα πολυμερή σε διαλύτη νερό με μορφή NPs μέσω νανοκαταβύθισης φαίνονται στον πίνακα 11, όπου υπολογίστηκαν με βάση την εξίσωση E18.



Σχήμα 27: Κανονικοποιημένο Φάσμα διέγερσης και εκπομπής των nanoprecipitated NPs του BTTPD-Th (CPN1) σε διαλύτη νερό (δισαπεσταγμένο) υπό ατμόσφαιρα αργού.



Σχήμα 28: Κανονικοποιημένο Φάσμα διέγερσης και εκπομπής των nanoprecipitated NPs του IDTDTDP-Ph (CPN2) σε διαλύτη νερό (δισαπασταγμένο) υπό ατμόσφαιρα αργού.



Σχήμα 29: Κανονικοποιημένο Φάσμα διέγερσης και εκπομπής των nanoprecipitated NPs του IDTDTDP-Th (CPN3) σε διαλύτη νερό (δισαπασταγμένο) υπό ατμόσφαιρα αργού.

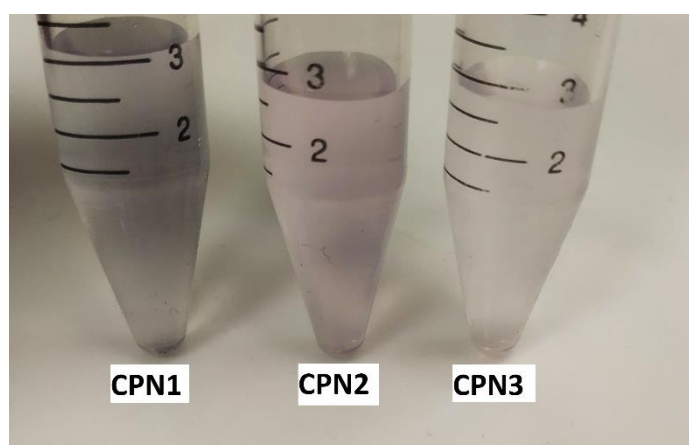
Βλέποντας τον πίνακα 11, βλέπουμε ότι η κβαντική απόδοση του CPN2 σε διαλύτη νερό με μορφή nanoprecipitated NPs είναι μεγαλύτερη από τα 3, με τιμή περίπου 9,2% ενώ το CPN1 και το CPN3 έχουν σχεδόν ίδια περίπου τιμή 3,5%. Οι κβαντικές αυτές αποδόσεις είναι πολύ μικρότερες απ' αυτές που είδαμε στο κεφάλαιο 6.1.4,

Πίνακας 11: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων από φασματοσκοπία φθορισμού για τα CPNs σε νερό μέσω νανοκαταβύθισης.

αλλά ήταν αναμενόμενο μιας και τα CPs αυτά είναι υδρόφοβα και το νερό δεν αποτελεί «καλό διαλύτη», παρότι με την μέθοδο της νανοκαταβύθισης είναι εφικτό να «διαλυθεί» μία ποσότητα αυτών. Παρ' όλα αυτά, τα CPs πακτώνονται λόγω της υδροφοβικότητας τους και αυτό πιθανώς να προκαλεί και αυτή την απόσβεση στον φθορισμό που οδηγεί σε χαμηλότερες κβαντικές αποδόσεις.

Πολυμερή σε μορφή nanoprecipitated NPs	Ενέργεια Απλής Κατάστασης (kcal/mol)	Μέσος όρος QY	Τυπική απόκλιση της QY
BTTPD-Th/CPN1	43,7	0,035	0,003
IDTDTPD-Ph/CPN2	45,8	0,092	0,002
IDTDTPD-Th/CPN3	45,8	0,035	0,002

Τελικώς, ακολουθεί φωτογραφία των συντιθέμενων CPNs σε διαλύτη νερό μέσω νανοκαταβύθισης.

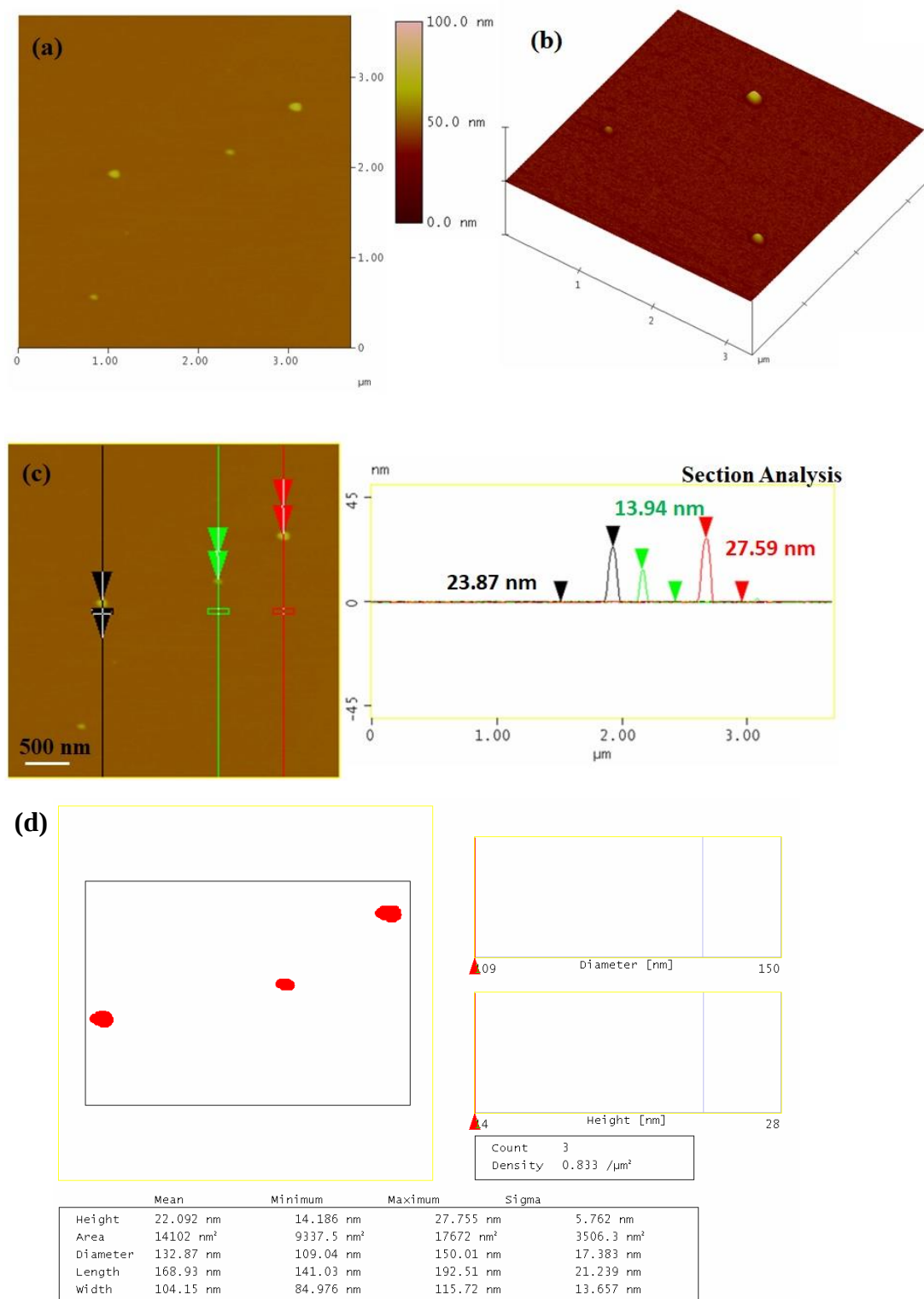


Εικόνα 42: Τα υπό μελέτη nanoprecipitated CPNs της παρτίδας 10.

6.2.4.: Χαρακτηρισμός μέσω AFM των nanoprecipitated NPs

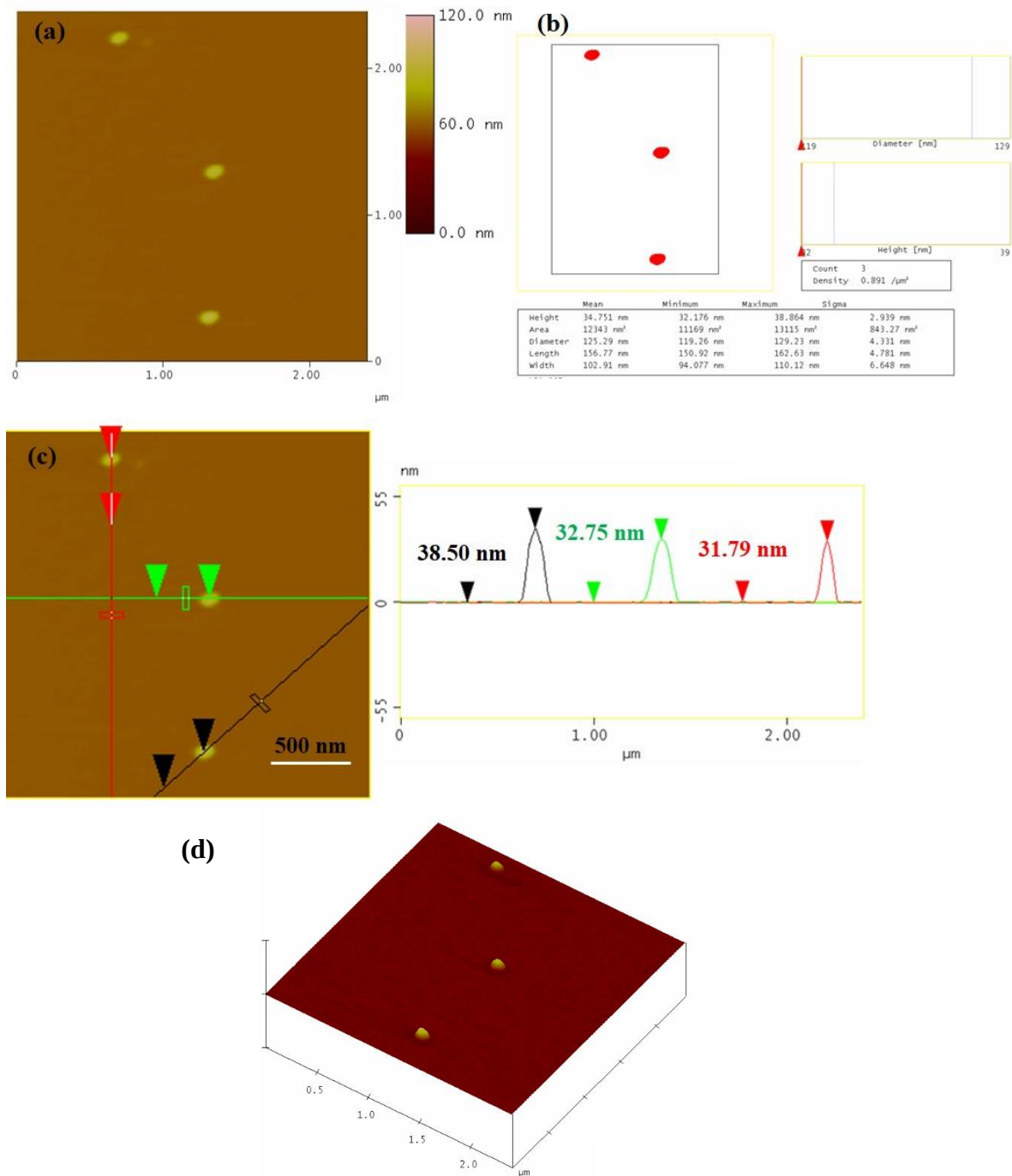
Παρακάτω παρουσιάζονται οι εικόνες AFM (Σχήμα 24) που αντιστοιχούν στις περιοχές σάρωσης διαστάσεων 3,5 x 3,5 μm για τα νανοσωματίδια του BTTPD-Th. Το μέγεθος των νανοσωματιδίων είναι 23.87nm, 27.59nm και 13.94nm, αντίστοιχα. Από τις εικόνες ύψους παρατηρείται ότι η μορφή τους είναι ατελής σφαιρική (οβάλ) με μέση διάμετρο 132.87 nm και μέσο ύψος που κυμαίνεται στα 22 nm (Σχήμα 24d).

➤ BTTPD-Th/CPN1



Σχήμα 30: Απεικόνιση AFM των nanoprecipitated NPs του BTTPD-Th όπου **a)** εικόνα ύψους, **b)** 3D μορφολογία, **c)** εικόνα τοπογραφικού προφίλ και **d)** πίνακας αποτελεσμάτων σε nm των χαρακτηριστικών των NPs μέσω του λογισμικού.

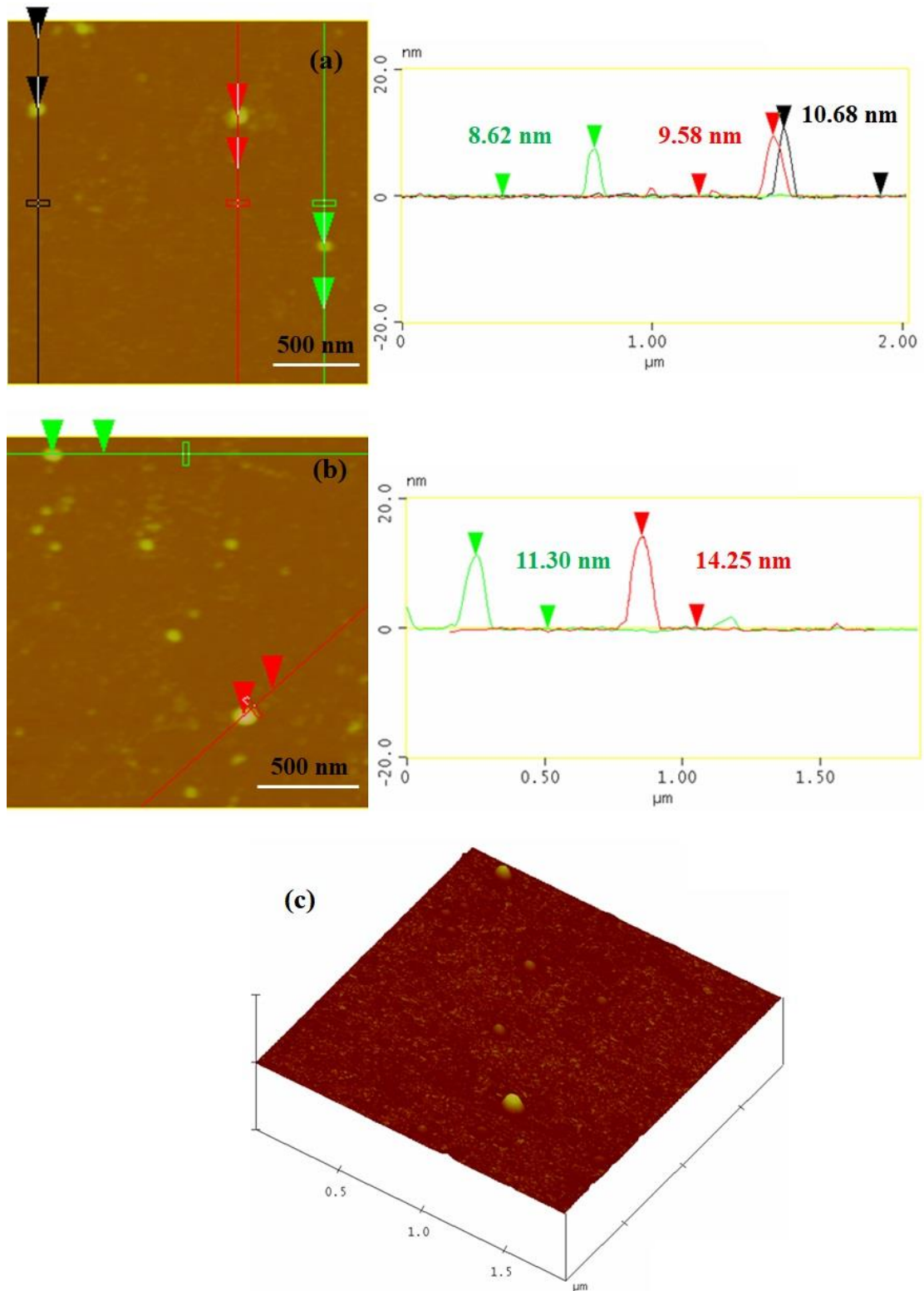
➤ IDTDPD-Ph/CPN2



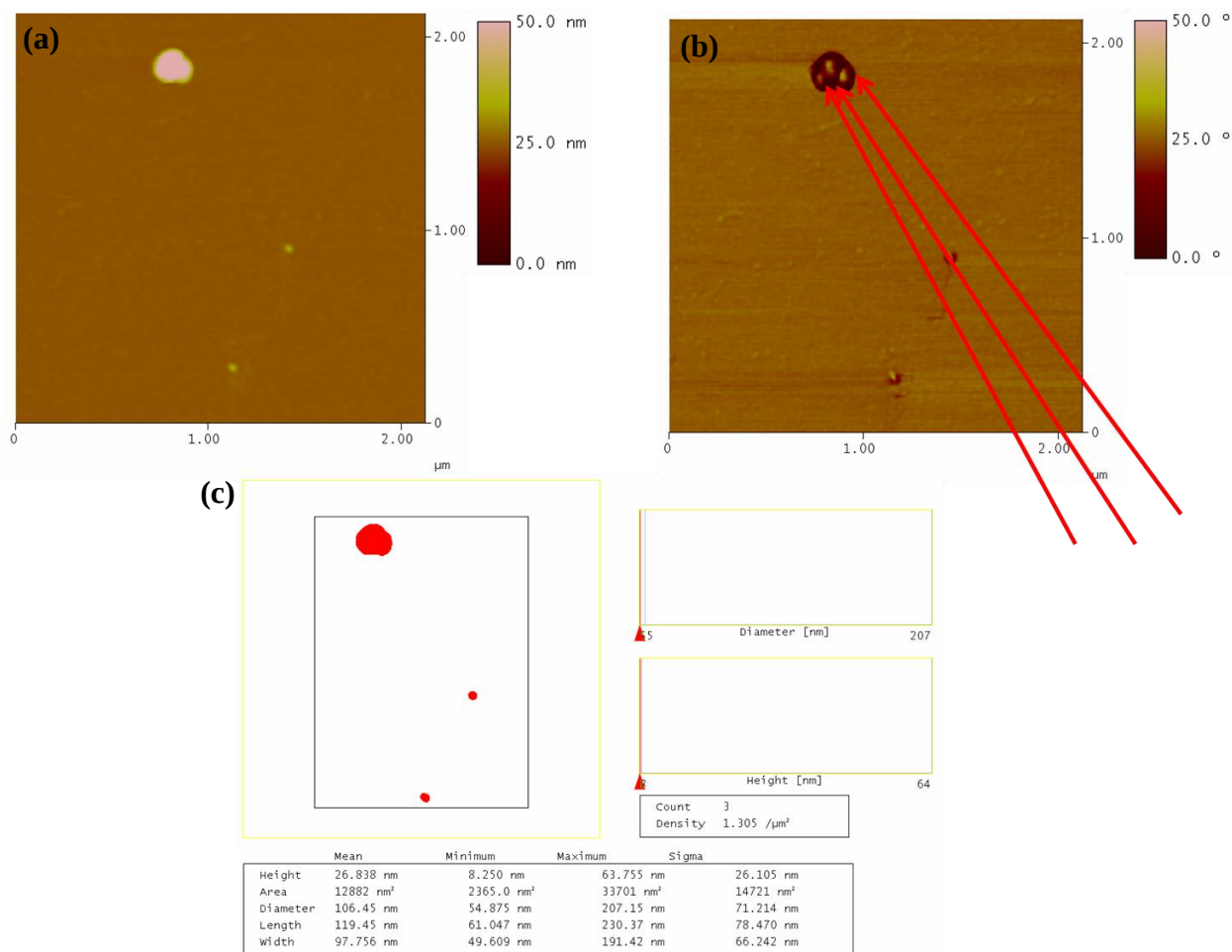
Σχήμα 31: Απεικόνιση AFM των nanoprecipitated NPs του IDTDPD-Ph όπου **a)** εικόνα ύψους, **b)** πίνακας αποτελεσμάτων σε nm των χαρακτηριστικών των NPs μέσω του λογισμικού, **c)** εικόνα τοπογραφικού προφίλ και **d)** 3D μορφολογία.

Οι παραπάνω AFM εικόνες τοπογραφικού προφίλ (Σχήμα 25) των νανοδωματιδίων IDTDPD-Ph καταδεικνύουν την παρουσία νανοσωματιδίων, το μέγεθος των οποίων κυμαίνεται στην περιοχή 30-40 nm. Η μορφολογία τους είναι ατελής σφαιρική (οβάλ) και σε αυτή την περίπτωση παρουσιάζοντας μια μέση διάμετρο της τάξης των 125.29 nm και μέσο ύψος περίπου 34.8 nm (Σχήμα 25 b).

➤ IDTDTPD-Th/CPN3



Σχήμα 32: Απεικόνιση AFM των nanoprecipitated NPs του IDTDTPD-Th όπου **a)** εικόνα τοπογραφικού προφίλ, **b)** εικόνα τοπογραφικού προφίλ και **c)** 3D μορφολογία.



Σχήμα 33: Απεικόνιση AFM των *nanoprecipitated NPs* του IDTDPD-Th όπου **a)** εικόνα ύψους, **b)** εικόνα φάσης με βέλη απεικόνισης συσσωματώματος αποτελούμενο από 3 NPs και **c)** πίνακας αποτελεσμάτων σε nm των χαρακτηριστικών μεγεθών των NPs μέσω του λογισμικού του AFM.

Από τις παραπάνω AFM εικόνες του Σχήματος 26, στα νανοσωματίδια του IDTDPD-Th υπήρχε μεγάλη ανομοιογένεια, ενώ ήταν παρούσες και άλλες μορφολογίες (πιθανόν λόγω ανεπιτυχούς φιλτραρίσματος ή αδιάλυτο πολυμερές). Παρότι τα νανοσωματίδια φιλτράρονται με φίλτρο 0.2 μm πριν χρησιμοποιηθούν, πιθανώς να χρειαζόταν επανάληψη του συγκεκριμένου πολυμερούς από άλλη παρτίδα. Το μέγεθος των νανοσωματιδίων κυμαίνεται από 8-14 nm. Παρατηρείται ότι η μορφή τους είναι ατελής σφαιρική (οβάλ) και σε αυτή την περίπτωση.

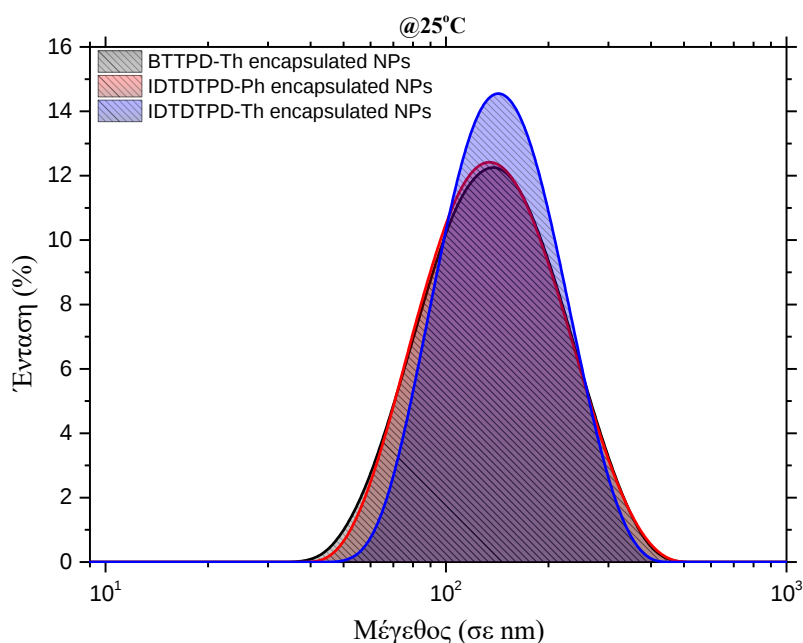
Στο σχήμα 27, φαίνεται μια ακόμα περιοχή του ίδιου δείγματος NPs που αντιστοιχεί σε περιοχή σάρωσης διαστάσεων 2.1 x 2.1 μm όπου φαίνεται καθαρά ένα συσσωμάτωμα αποτελούμενο από 3 επιμέρους νανοσωματίδια (Σχήμα 26b) και άλλα δύο, τα οποία είναι μικρότερα και σφαιρικά. Η ελάχιστη διάμετρος για όλα αυτά είναι περίπου 55 nm και η μέγιστη 207 nm, ενώ το ελάχιστο ύψος 8 nm και το μέγιστο 64 nm. Οι παρατηρούμενες διαφορές στις μέσες τιμές τόσο του ύψους όσο και της διαμέτρου οφείλονται λόγω της ταυτόχρονης παρουσίας μικρών νανοσωματιδίων και ενός συσσωματώματος.

Σε γενικό πλαίσιο, η μορφολογία που λαμβάνουν τα CPs στο νερό με την μορφή NPs και με μέθοδο παρασκευής την νανοκαταβύθιση δείχνει να είναι ατελώς σφαιρικά και με μία καλή ένδειξη του μεγέθους τους, σύμφωνα με την μικροσκοπία ατομικής δύναμης.

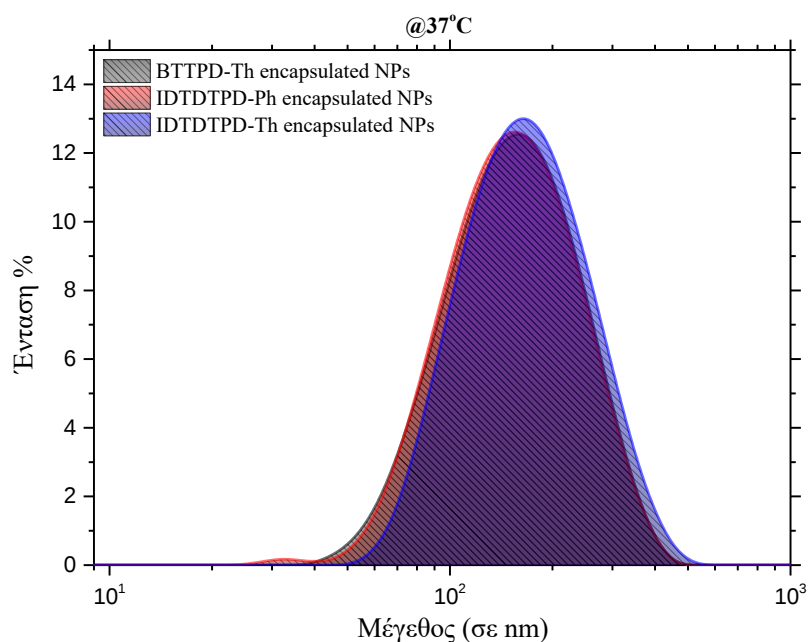
6.3.: Χαρακτηρισμός των encapsulated NPs

6.3.1.: DLS & Zeta potential των encapsulated NPs

Συνολικά φτιάχτηκε 2 παρτίδες (batches) για το κάθε πολυμερές με τη μορφή νανοσωματιδίων στο νερό με μέθοδο σύνθεσης εγκλωβισμού (encapsulation), τα οποία καλούνται encapsulated. Παρατηρήθηκε πιο έντονο χρώμα που υποδηλώνει τον μεγαλύτερο εγκλωβισμό των πολυμερών μέσω του αμφίφιλου στο νερό. Παρακάτω παρατίθενται για κάθε παρτίδα το μέγεθος των νανοσωματιδίων καθώς και το zeta δυναμικό σε θερμοκρασία 25 και 37°C (εκτός από την παρτίδα 1 όπου έχουμε μόνο στους 25°C) με μορφή διαγραμμάτων του μεγέθους συναρτήσει της έντασης % και σε πίνακες τα αναλυτικά αποτελέσματα σε μέσους όρους $\pm$ τυπική απόκλιση για τις παραμέτρους Z-Ave, πολυδιασπορά ή PDI, PK1mean και zeta potential. Σε αυτό το κεφάλαιο θα αναρτηθεί ενδεικτικά τα διαγράμματα αυτά με τους αντίστοιχους πίνακες της δεύτερης παρτίδας. Για το διάγραμμα της πρώτης παρτίδας βλ. Παράρτημα 3.



Σχήμα 34: Διάγραμμα δυναμικής σκέδασης φωτός, όπου αποδίδεται το ποσοστό των σκεδαζόμενων σωματιδίων συναρτήσει της έντασης της παρτίδας 2 των NPs στους 25°C.



Σχήμα 35: Διάγραμμα δυναμικής σκέδασης φωτός, όπου αποδίδεται το ποσοστό των σκεδαζόμενων σωματιδίων συναρτήσει της έντασης της παρτίδας 2 των NPs στους 37°C.

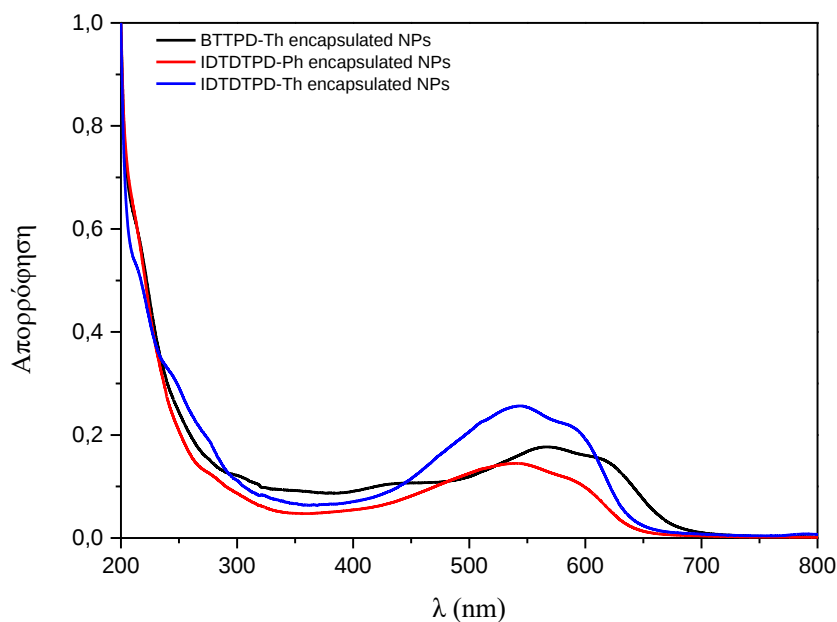
Δείγματα αμφιφιλικών NPs	DLS (25°C)			DLS (37°C)				
	Z-Ave (nm)	PDI	PK1 mean (nm)	Z-Ave (nm)	PDI	PK1 mean (nm)	Z potential	Std dev
BTTPD-Th	128,37 ± 1,49	0,146 ± 0,009	152,27 ± 2,22	139,3 ± 2,11	0,15 ± 0,004	165,2 ± 1,76	-6,29	9
IDTDTPD-Ph	129,37 ± 1,89	0,145 ± 0,011	152,6 ± 1,53	138,67 ± 2,35	0,145 ± 0,004	164,77 ± 2,08	-10,2	10,1
IDTDTPD-Th	137,73 ± 1,8	0,13 ± 0,012	160,1 ± 3,46	148,17 ± 1,94	0,144 ± 0,003	175,4 ± 2,47	-12,7	8,71

Πίνακας 12: Αποτελέσματα μετρήσεων DLS & δυναμικού zeta της παρτίδας 2 των encapsulated NPs στους 25 και 37°C.

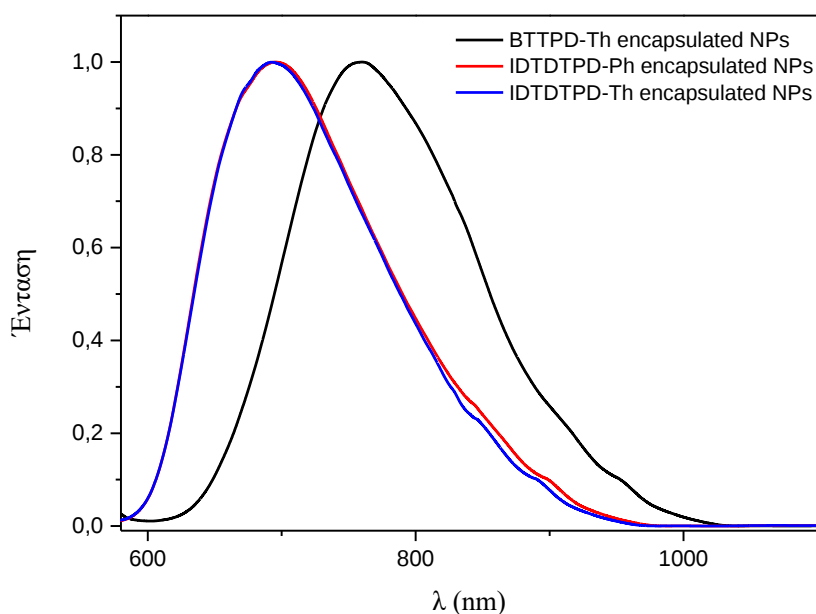
Με την μέθοδο αυτή τα νανοσωματίδια που κατασκευάστηκαν στην συγκεκριμένη παρτίδα φάνηκαν να έχουν μέγεθος περίπου 128-140nm και μικρό αρνητικό δυναμικό ζ. Παρ' όλα αυτά διατηρούν σχετικά το ίδιο μέγεθος και στις δύο θερμοκρασίες και οι πολυδιασπορές τους κυμαίνονται από 0,12-0,15 και έχουν ομοιόμορφη κατανομή με την παρουσία ενός πληθυσμού.

6.3.2.:Φασματοσκοπία UV-Vis & φθορισμού των encapsulated NPs

Σε αυτό το κεφάλαιο παρατίθενται τα φάσματα UV-Vis και φθορισμού των 3 CPs με την μορφή νανοσωματιδίων και μέθοδο σύνθεσης τον εγκλωβισμό μαζί με το αμφίφιλο *mPEG-b-PLGA*.



Σχήμα 36: Φάσμα απορρόφησης UV-Vis των 3 CPs σε διαλύτη νερό (δισαπασταγμένο) με την μορφή encapsulated NPs.



Σχήμα 37: Κανονικοποιημένο φάσμα εκπομπής των 3 CPs σε διαλύτη νερό (δισαπασταγμένο) με την μορφή encapsulated NPs.

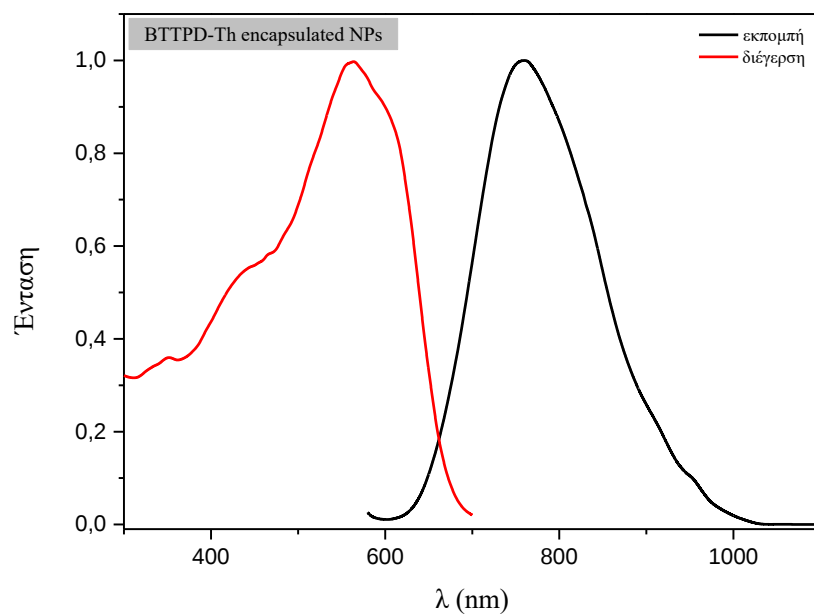
Πολυμερή σε μορφή encapsulated NPs	$\lambda_{\max}$ (nm) Απορρόφηση	$\lambda_{\max}$ (nm) Εκπομπή
BTTPD-Th/CPN1	565.0, 610.0 (ώμος)	758.0
IDTDPD-PH/CPN2	545.0, 590.0 (ώμος)	699.0
IDTDPD-Th/CPN3	545.0, 593.0 (ώμος)	694.0

Πίνακας 13: Μέγιστα μήκη κύματος απορρόφησης και εκπομπής των συντιθέμενων CPs με μορφή NPs μέσω εγκλωβισμού.

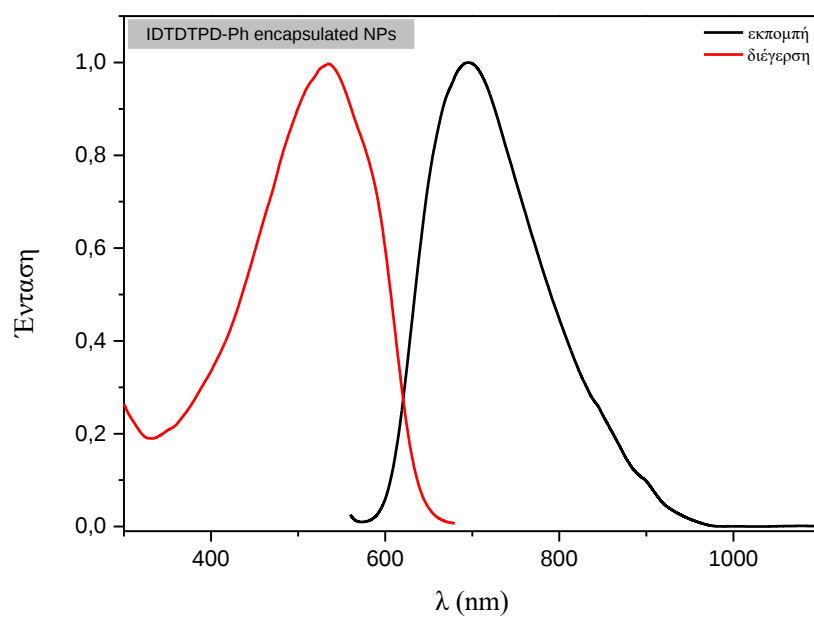
Στην περίπτωση των ίδιων συντιθέμενων CPs, όταν αυτά διαλυθούν σε διαλύτη νερό με μορφή NPs μέσω εγκλωβισμού μαζί με αμφίφιλο πολυμερές τότε σε σχέση με τα CPs σε THF και τα CPNPs μέσω νανοκαταβύθισης, παρατηρείται ότι διατηρείται η υψοχρωμική μετατόπιση από το CPN1 προς το CPN3. Υπάρχουν πάλι ώμοι στο φάσμα απορρόφησης και για τα 3, αλλά με τη διαφορά από τα CPs στο THF ότι αυτή τη φορά βρίσκονται βαθυχρωμικά από το μέγιστο μήκος κύματος. Αυτό παρατηρηθήκε και στα NPs μέσω νανοκατανύθισης. Επιπλέον, στην περίπτωση του CPN2 και CPN3 οι διαφορά στο μέγιστο μήκος κύματος είναι πιο μικρή (~5nm) όταν αυτά βρίσκονται υπό μορφή νανοσωματιδίων μέσω εγκλωβισμού, όπως ακριβώς και στην περίπτωση της νανοκαταβύθισης.

Όσον αφορά την εκπομπή των CPs σε διαλύτη THF, παρατηρούμε ότι το CPN1 εμφανίζει μία κορυφή στο φάσμα εκπομπής, ενώ σε διαλύτη THF εμφάνιζε δύο. Η κορυφή αυτή εκπομπής στο CPN1 βρίσκεται στην περιοχή NIR-I, ενώ των CPN2 και CPN3 βρίσκονται στην περιοχή του ορατού πλησιάζοντας οριακά την περιοχή NIR-I. Άρα και με τις δύο μεθόδους κατασκευής NPs παρατηρείται ένα παρόμοιο προφίλ απορρόφησης και φθορισμού με ελάχιστες διαφορές της τάξης 1-4nm μεταξύ των ίδιων CPNPs, οι οποίες αναμένονται να υπάρχουν λόγω της παρουσίας ενός δεύτερου αμφίφιλου πολυμερούς στην περίπτωση παρασκευής με εγκλωβισμό.

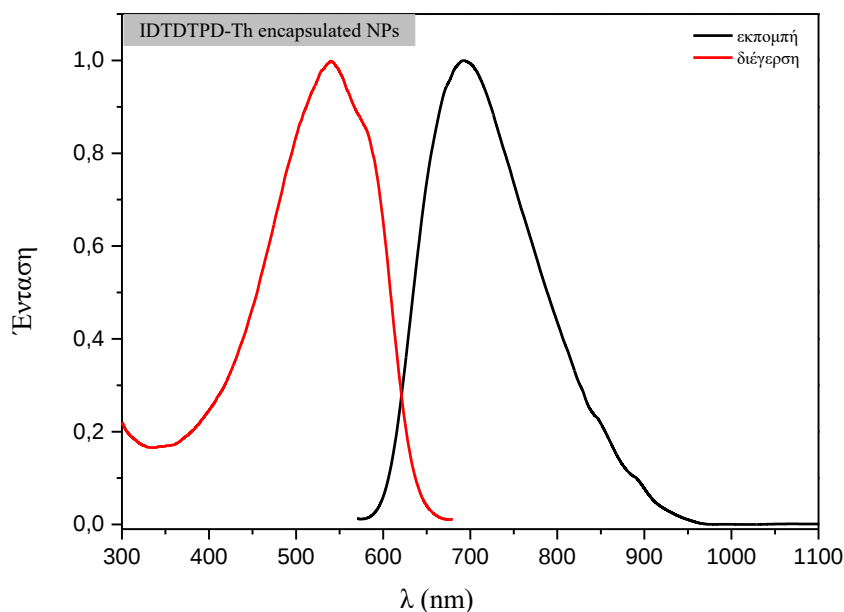
Αναλυτικότερα, παρατίθενται ακολούθως και τα διαγράμματα διέγερσης-εκπομπής για κάθε CP με μορφή NPs μέσω εγκλωβισμού ξεχωριστά (Σχήματα 32,33,34) με βάση τα οποία υπολογίζεται το μήκος κύματος τομής των δύο αυτών καμπυλών με το οποίο υπολογίζεται η ενέργεια απλής κατάστασης (Εξίσωση 21) και οι κβαντικές αποδόσεις (Πίνακας 14). Οι κβαντικές αποδόσεις (QY) υπολογίστηκαν όπως περιεγράφηκαν στα κεφάλαια 4.4 & 5.5 και οι τιμές που βρέθηκαν για τα πολυμερή σε διαλύτη νερό με μορφή NPs μέσω νανοκαταβύθισης φαίνονται στον πίνακα 14, όπου υπολογίστηκαν με βάση την εξίσωση E18.



Σχήμα 38: Κανονικοποιημένο Φάσμα διέγερσης και εκπομπής των *encapsulated NPs* του BTTPD-Th (CPN1) σε διαλύτη νερό (δισαπεσταγμένο) υπό ατμόσφαιρα αργού.



Σχήμα 39: Κανονικοποιημένο Φάσμα διέγερσης και εκπομπής των *encapsulated NPs* του IDTDTPD-Ph (CPN2) σε διαλύτη νερό (δισαπεσταγμένο) υπό ατμόσφαιρα αργού.



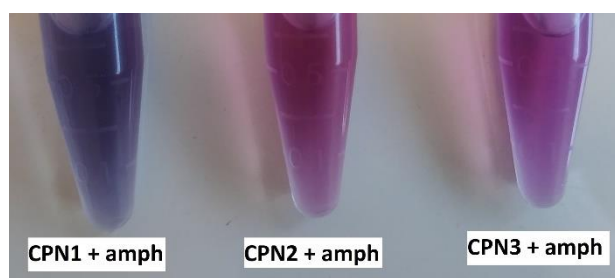
Σχήμα 40 : Κανονικοποιημένο Φάσμα διέγερσης και εκπομπής των *encapsulated NPs* του IDTDTPD-Th (CPN3) σε διαλύτη νερό (δισαπεσταγμένο) υπό ατμόσφαιρα αργού.

Βλέποντας τον πίνακα 14, βλέπουμε ότι η κβαντική απόδοση του CPN2 σε διαλύτη νερό με νανοκαταβυθιζόμενη μορφή NPs είναι μεγαλύτερη από τα 3, με τιμή περίπου 7% (όπως και με την περίπτωση των nanoprecipitated NPs) ενώ το CPN3 έχει περίπου 4,7% και το CPN1 έχει 3%. Για τους ίδιους λόγους που αναφέρθηκαν και στο κεφάλαιο 6.2.2, οι κβαντικές αποδόσεις και σε αυτήν την περίπτωση είναι μικρότερες από τις αντίστοιχες των CPs σε THF.

Πολυμερή σε μορφή <i>encapsulated NPs</i>	Ενέργεια Απλής Κατάστασης (kcal/mol)	Μέσος όρος QY	Τυπική απόκλιση της QY
BTTPD-Th	43,3	0,029	0,001
IDTDTPD-Ph	46,1	0,07	0,002
IDTDTPD-Th	46,0	0,0466	0,0003

Πίνακας 14: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων από φασματοσκοπία φθορισμού για τα CPNs σε νερό μέσω εγκλωβισμού.

Τελικώς, ακολουθεί φωτογραφία των συντιθέμενων CPNs σε διαλύτη νερό μέσω εγκλωβισμού.

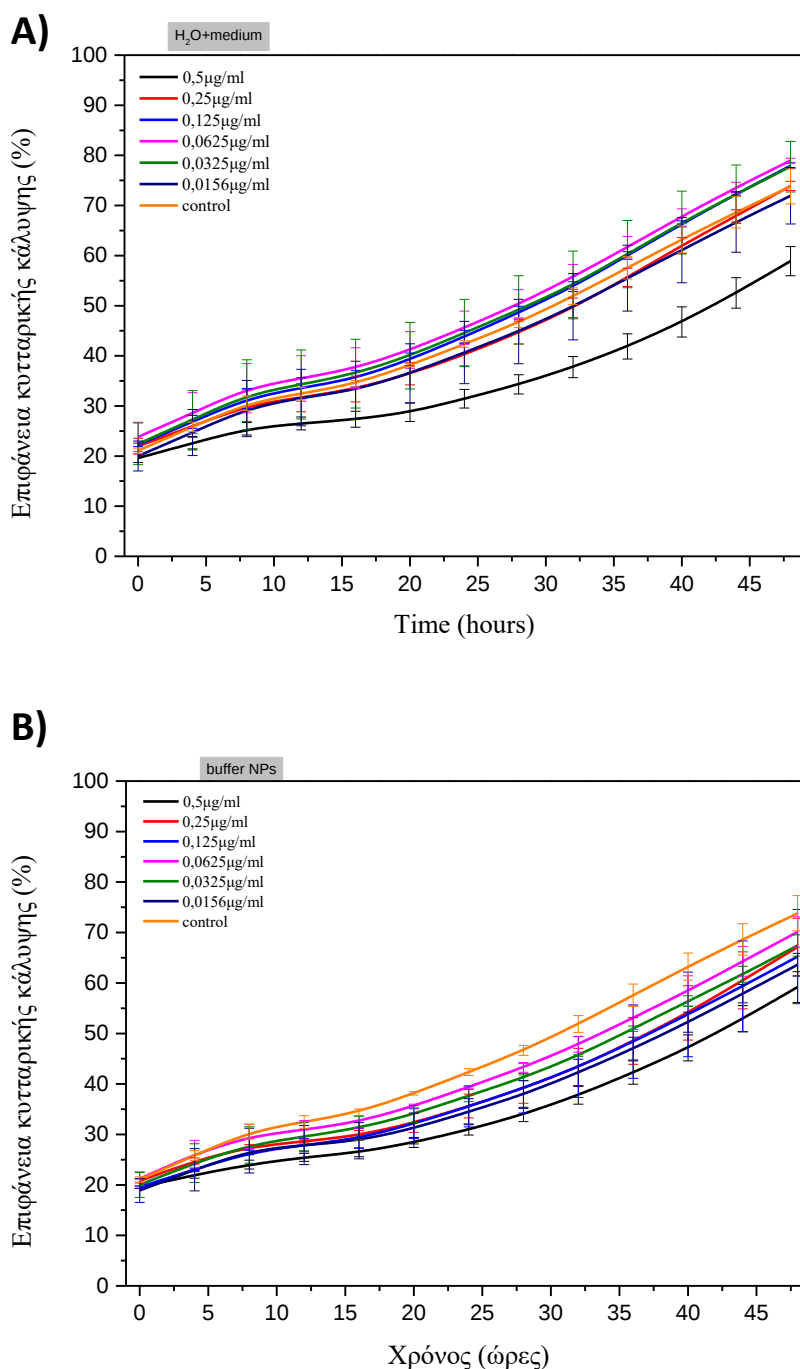


Εικόνα 43: Τα υπό μελέτη *encapsulated CPNs* της παρτίδας 2.

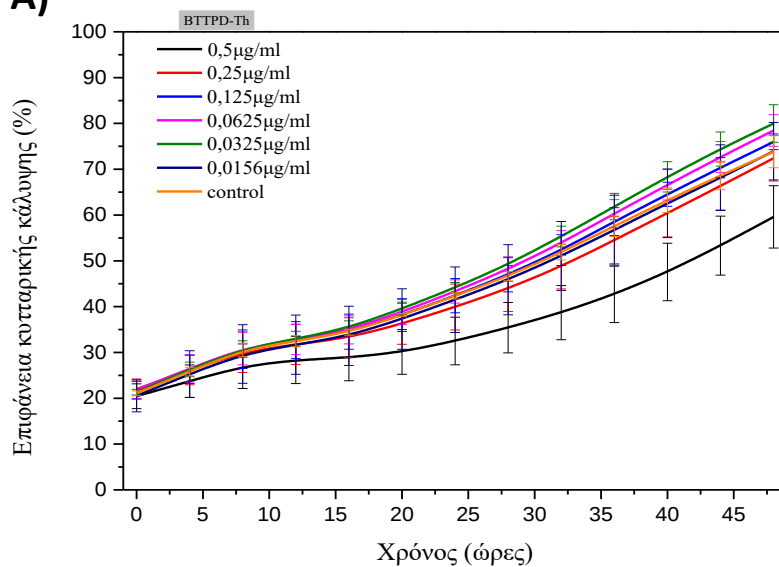
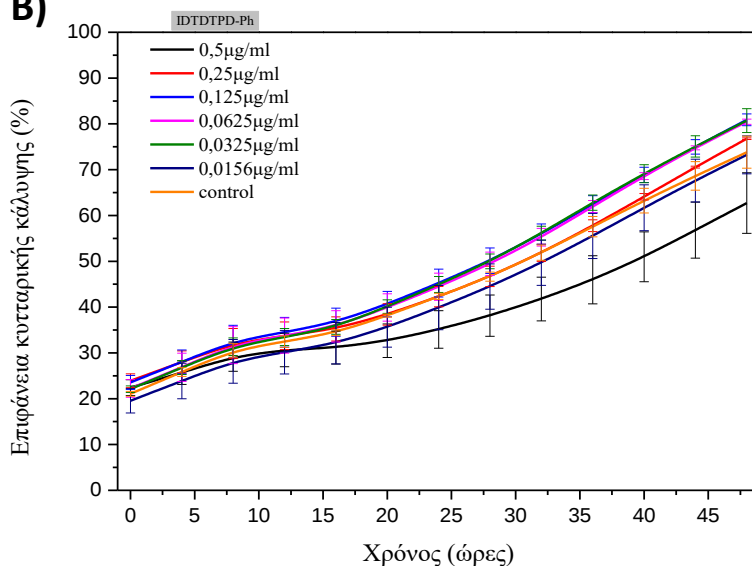
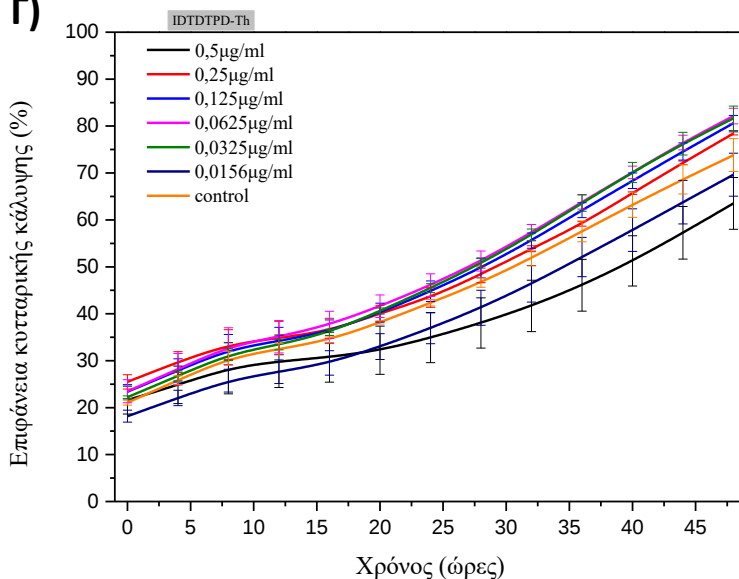
6.4.: Αποτελέσματα πειραμάτων *in vitro*

6.4.1.: Κυτταροτοξικότητα των 2 κυτταρικών σειρών με τα NPs (από νανοκαταβύθιση) μέσω της μεθόδου του IncuCyte®

Αρχικά, θα παρουσιαστούν το σχήμα 41 Α) και 41Β) με προσθήκη H₂O και buffer NPs αντίστοιχα στα κύτταρα HCT-116 ως διαγράμματα αναφοράς και αποδεικνύουν ότι η ανάπτυξη των κυττάρων δεν επηρεάζεται από αυτούς τους παράγοντες που αναφέρθηκαν και στο κεφάλαιο 5.7. Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα σχήματα 42 Α), Β) και Γ) των νανοσωματιδίων μέσω νανοκαταβύθισης BTTPD-Th, IDTDTPD-Ph, IDTDTPD-Th ή αλλιώς CPN1, CPN2, CPN3 αντίστοιχα.

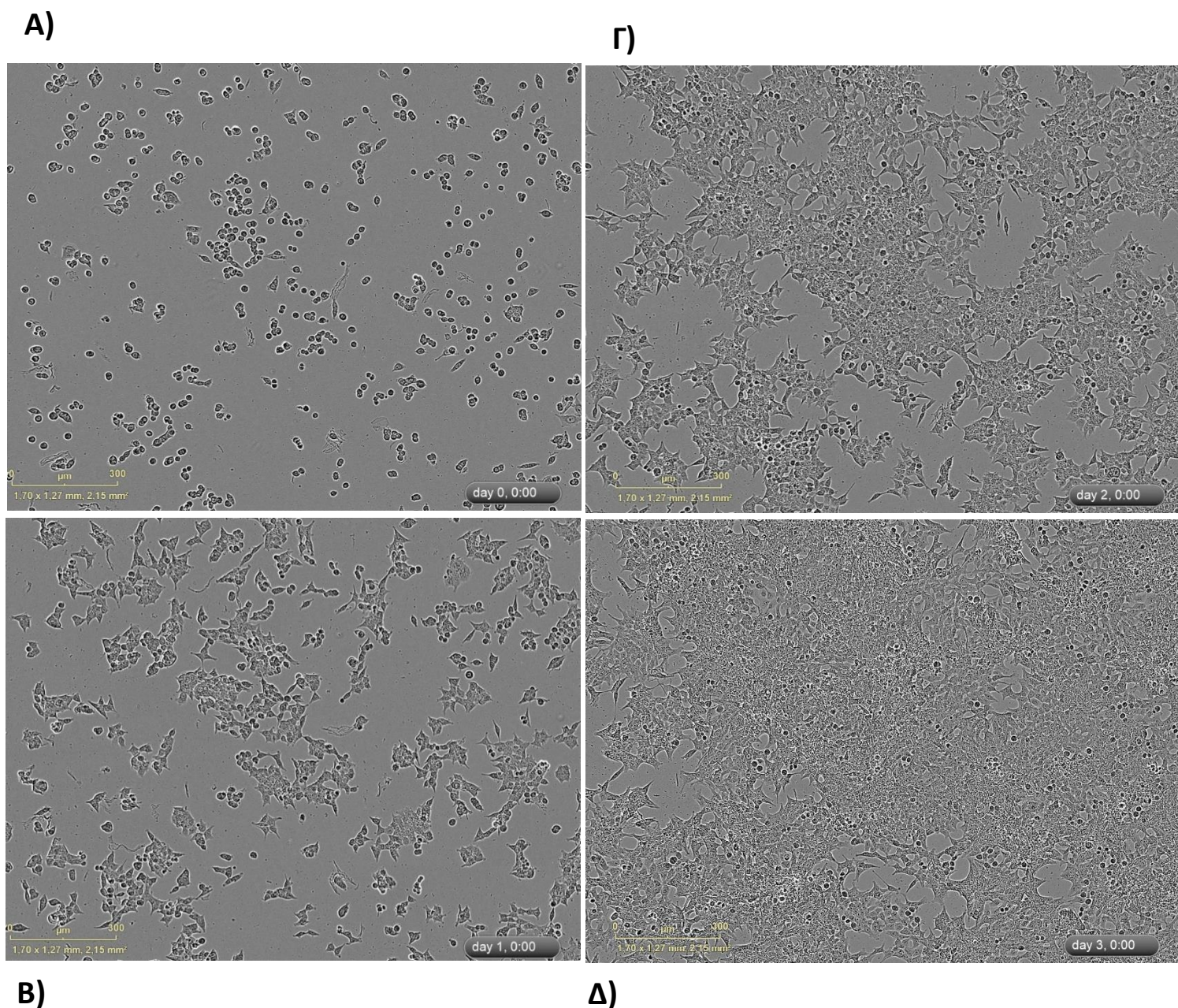


Σχήμα 41: Διαγράμματα της επιφάνειας κυτταρικής κάλυψης (%) συναρτήσει του χρόνου των HCT-116 κυττάρων με αντίστοιχη προσθήκη **A)** νερού και **B)** buffer NPs, που χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα αναφοράς σε σύνολο 48h.

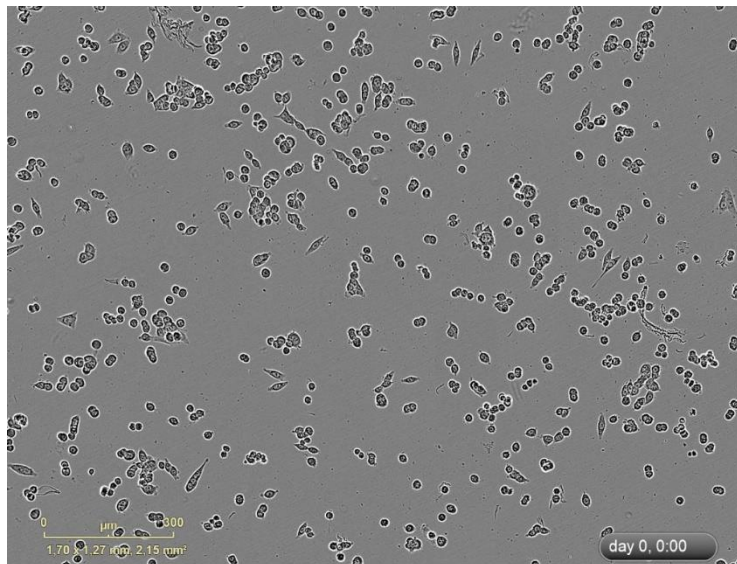
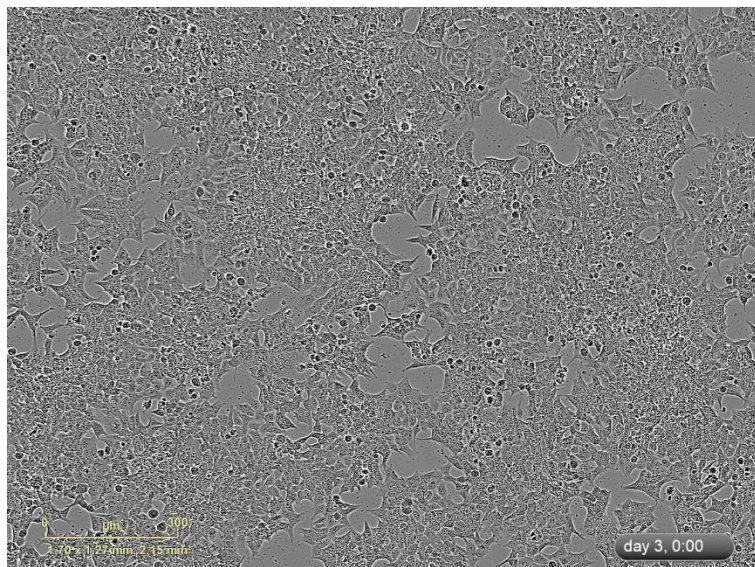
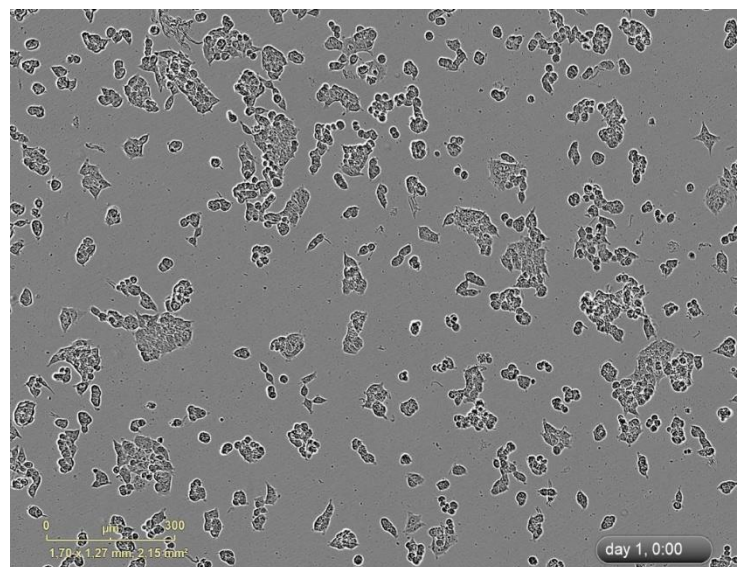
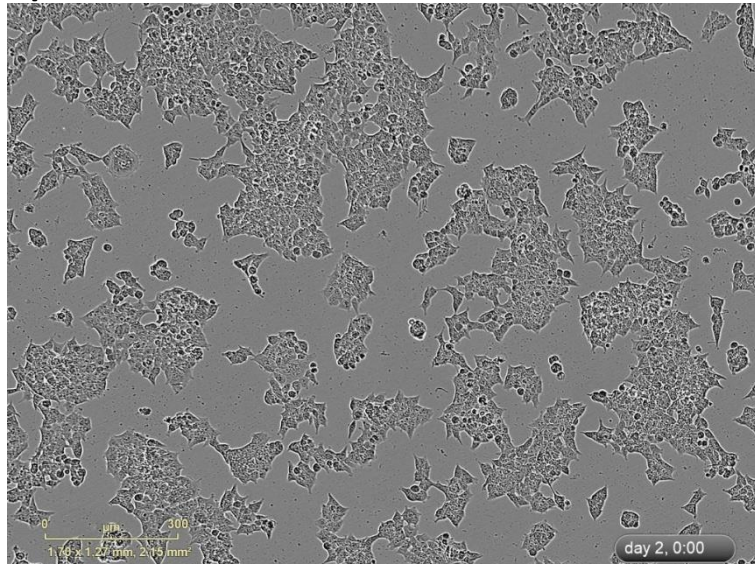
A)**B)****Γ)**

Σχήμα 42: Διαγράμματα της επιφάνειας κυτταρικής κάλυψης (%) συναρτήσει του χρόνου των HCT-116 κυττάρων με αντίστοιχη προσθήκη **A)** BTTPD-Th NPs, **B)** IDTDTPD-Ph NPs και **Γ)** IDTDTPD-Th NPs, που χρησιμοποιήθηκαν ως εξεταζόμενα δείγματα σε σύνολο 48h.

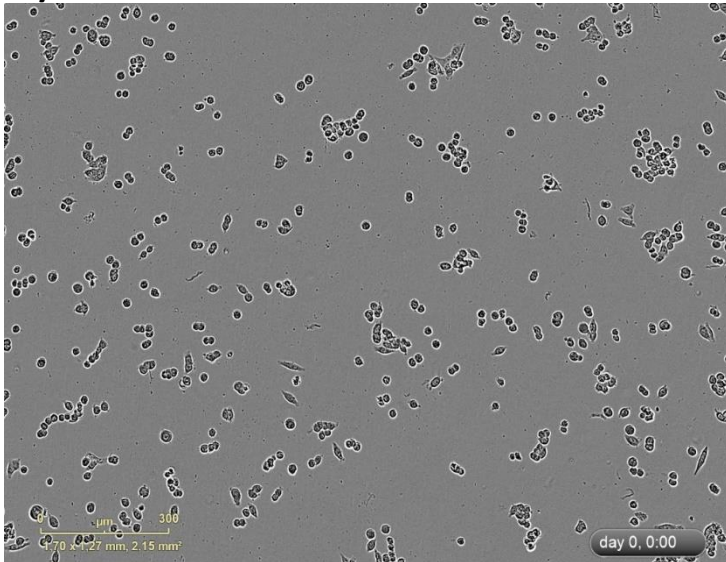
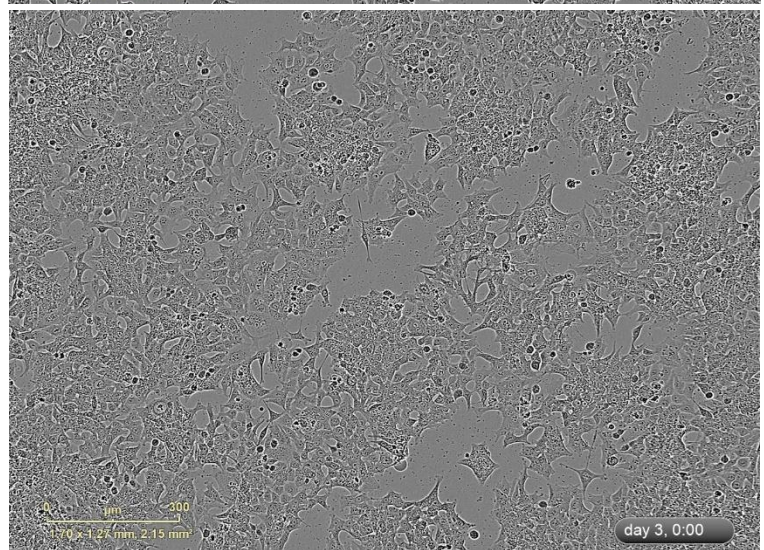
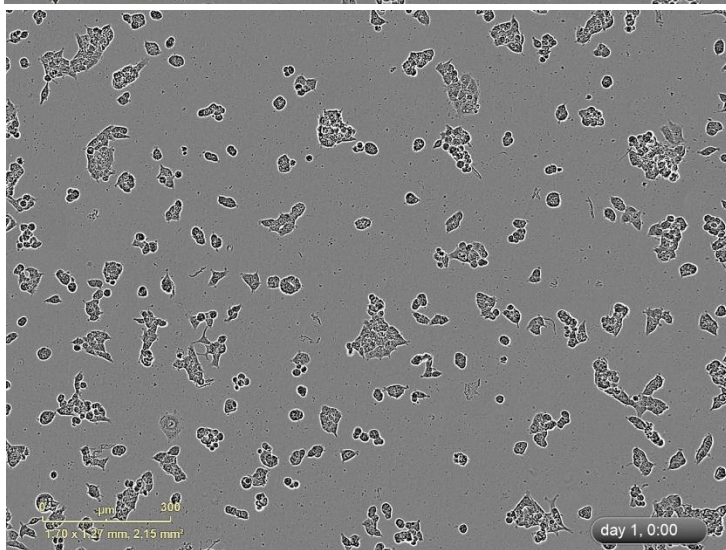
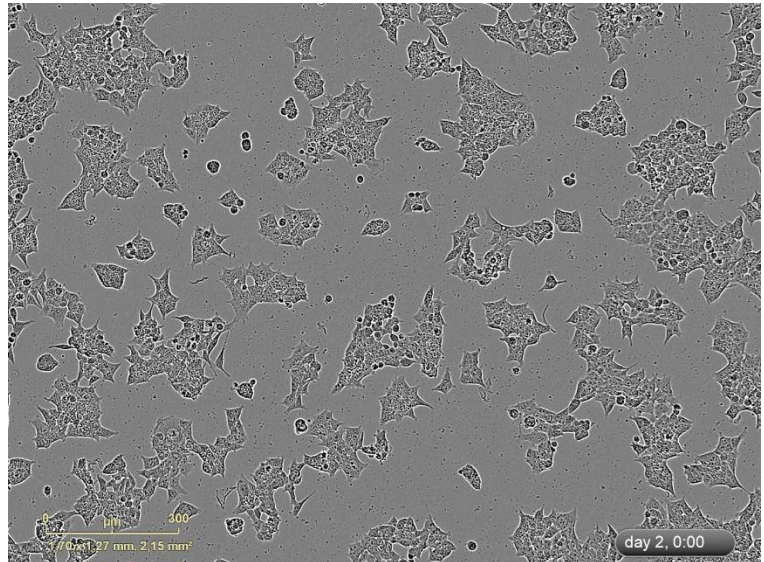
Παρατηρούμε ότι η ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων και με τα τρία διαφορετικά νανοσωματίδια φαίνεται να είναι φυσιολογική χωρίς καμία επίδραση από αυτά. Φαίνεται να είναι μηδαμινή η επίδραση για τις συγκεντρώσεις 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0325, 0.0156 $\mu\text{g/ml}$, ενώ για τη συγκέντρωση 0.5 $\mu\text{g/ml}$ υπάρχει μία ελάχιστη έως μηδαμινή επίδραση τοξικότητας των νανοσωματίδιων της τάξης 5% περίπου. Ακολουθεί η παρουσίαση κάποιων ενδεικτικών φωτογραφιών των κυττάρων HCT-116 από το IncuCyte® για τη χρονική στιγμή 0, 24, 48 και 72 ώρες, συγκέντρωσης 0.5 $\mu\text{g/ml}$ για κάθε είδος διαφορετικών νανοσωματίδιων συζυγιακού πολυμερούς μαζί με τις φωτογραφίες αναφοράς των κυττάρων για τα ίδια χρονικά διαστήματα στις οποίες δεν περιέχονται τα νανοσωματίδια. Για περισσότερες φωτογραφίες και στις υπόλοιπες συγκεντρώσεις βλ. Παράρτημα 4.



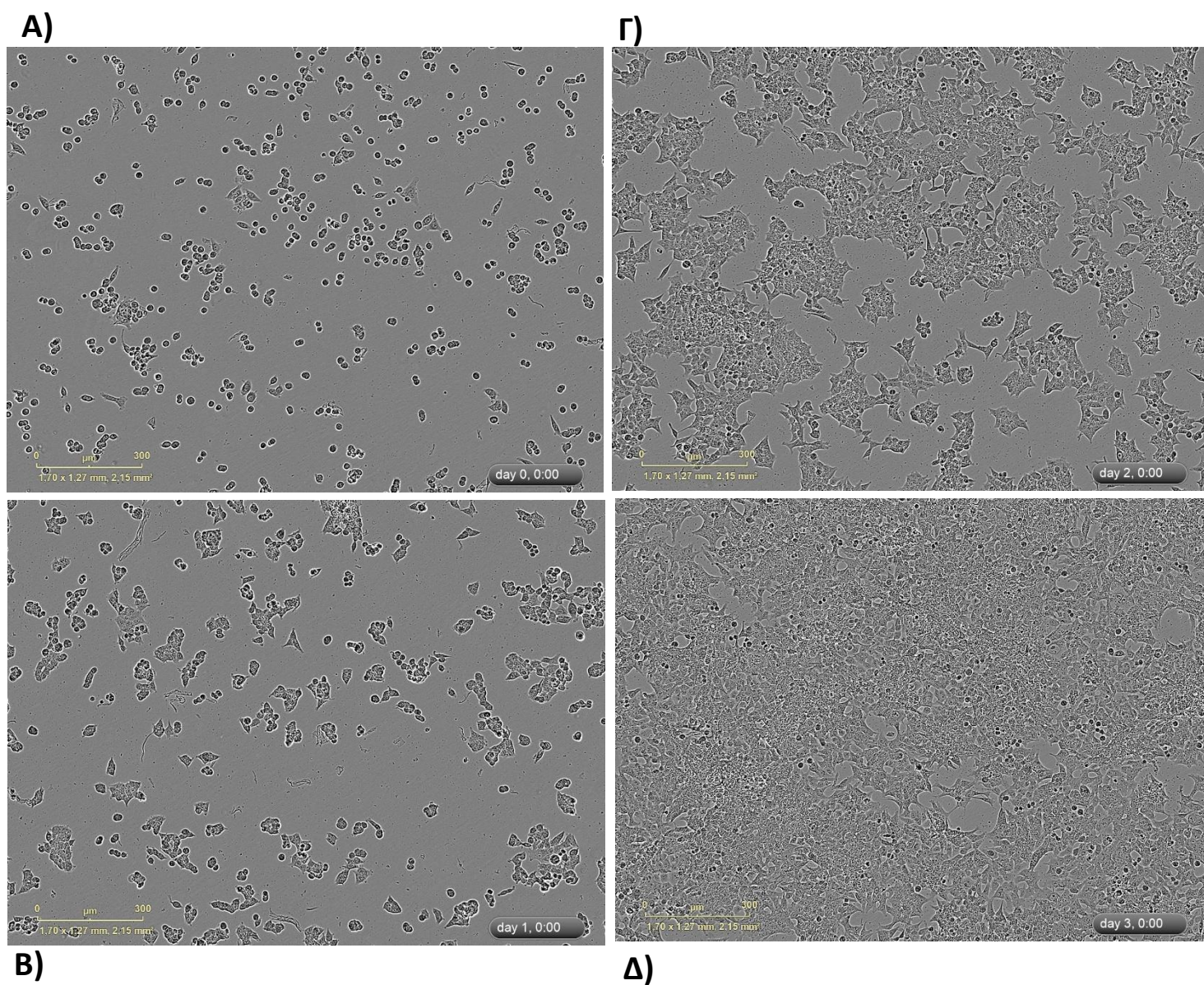
Εικόνα 44: Απεικόνιση HCT-116 κυττάρων (control) στην χρονική στιγμή **A)** 0h, **B)** 24h, **Γ)** 48h, **Δ)** 72h.

A)**Γ)****B)****Δ)**

Εικόνα 45: Απεικόνιση HCT-116 κυττάρων με προσθήκη BTTPD-Th NPs συγκέντρωσης 0,5μg/ml στην χρονική στιγμή A) 0h, B) 24h, Γ) 48h, Δ) 72h.

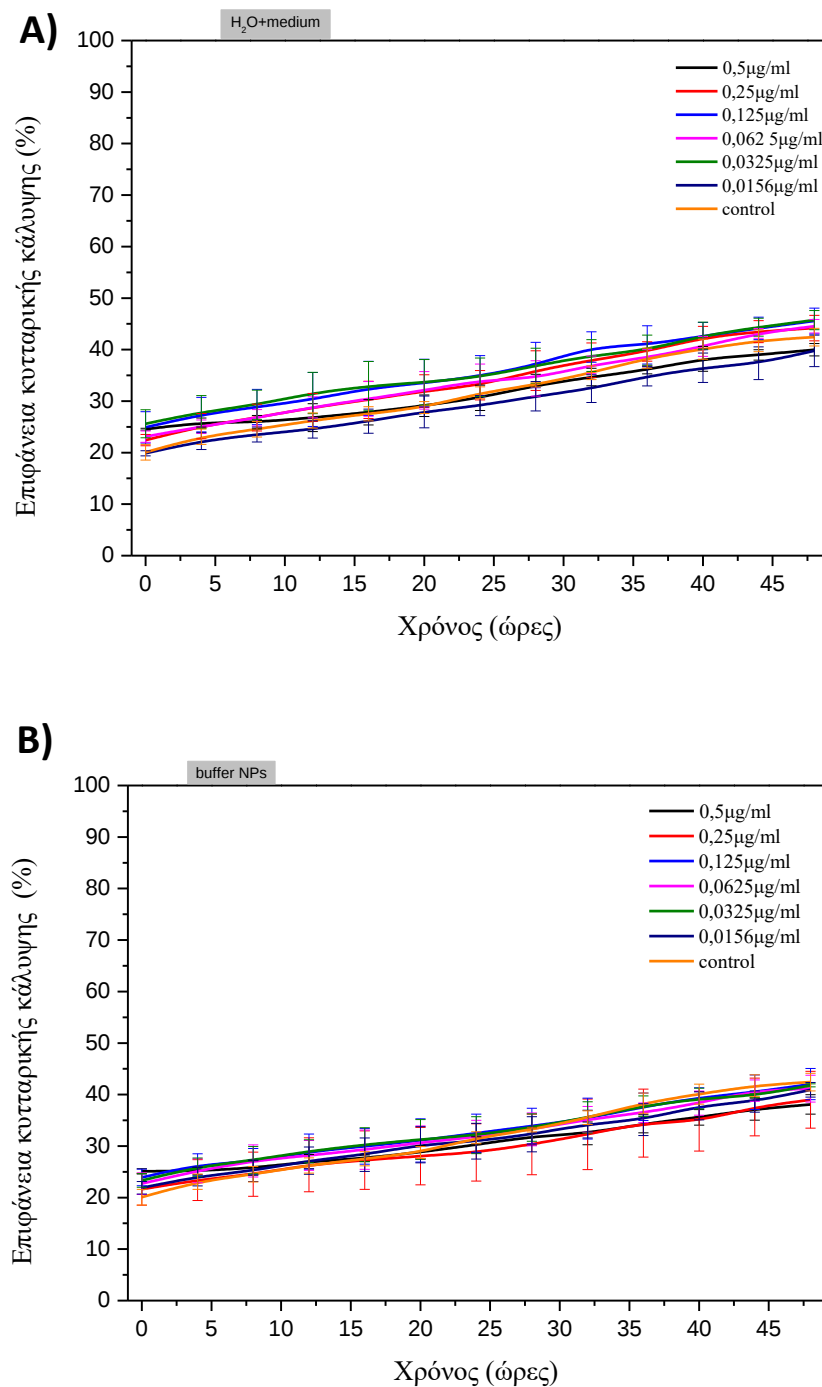
A)**Γ)****B)****Δ)**

Εικόνα 46: Απεικόνιση HCT-116 κυττάρων με προσθήκη IDTTPD-Ph NPs συγκέντρωσης 0,5μg/ml στην χρονική στιγμή **A)** 0h, **B)** 24h, **Γ)** 48h, **Δ)** 72h.

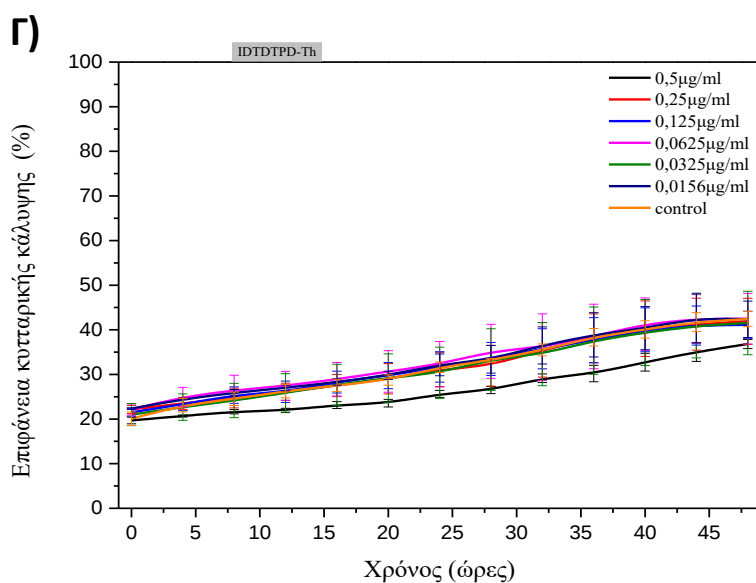
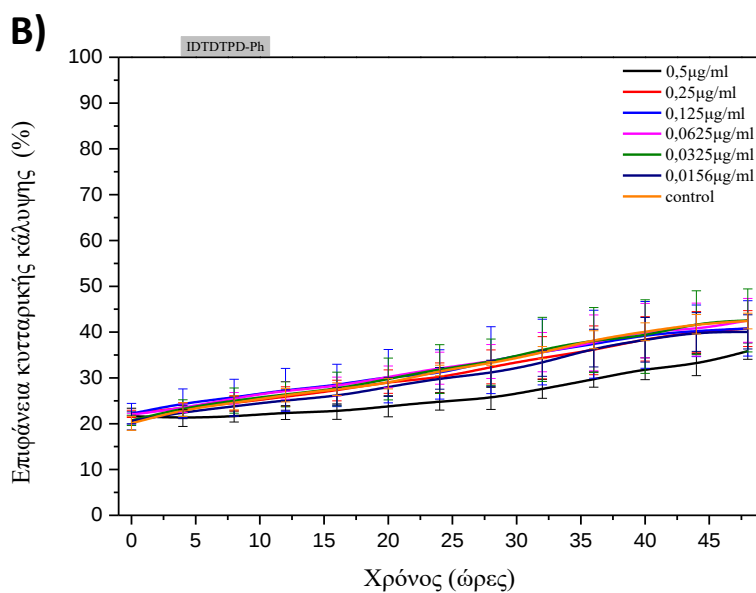
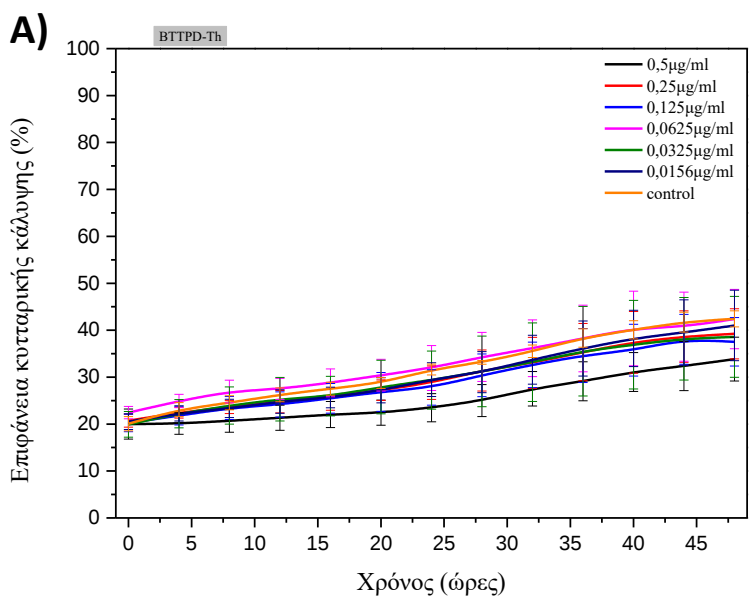


Εικόνα 47: Απεικόνιση HCT-116 κυττάρων με προσθήκη IDTDTPD-Th NPs συγκέντρωσης 0,5μg/ml στην χρονική στιγμή **A)** 0h, **B)** 24h, **Γ)** 48h, **Δ)** 72h.

Συνεχίζοντας στο ίδιο μοτίβο παρουσιάζονται και τα αντίστοιχα σχήματα 37,38 για την κυτταρική σειρά HUVECs.

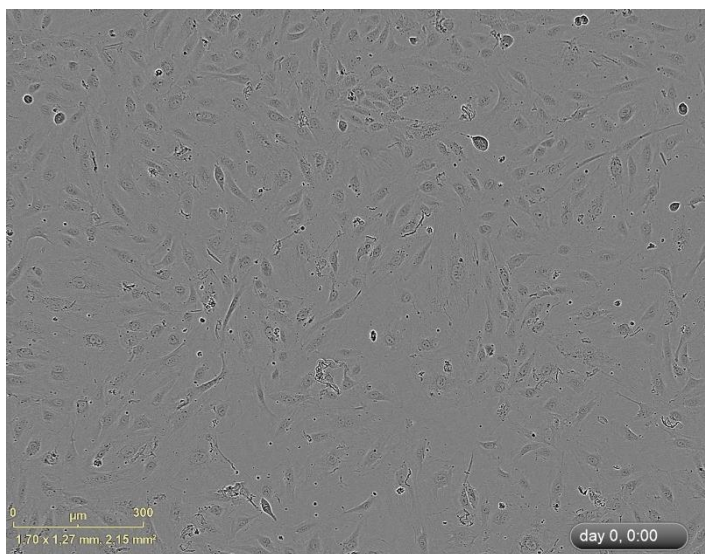


Σχήμα 43: Διαγράμματα της επιφάνειας κυτταρικής κάλυψης (%) συναρτήσει του χρόνου των HUVEC κυττάρων με αντίστοιχη προσθήκη **A)** νερού και **B)** buffer NPs, που χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα αναφοράς σε σύνολο 48h.

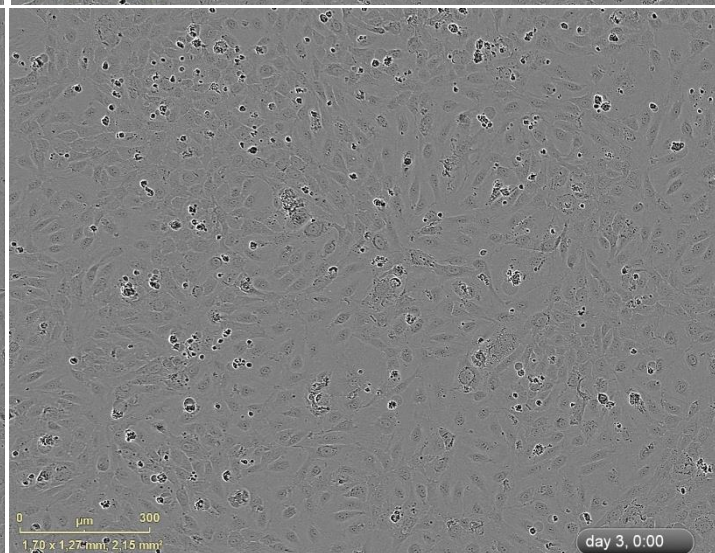
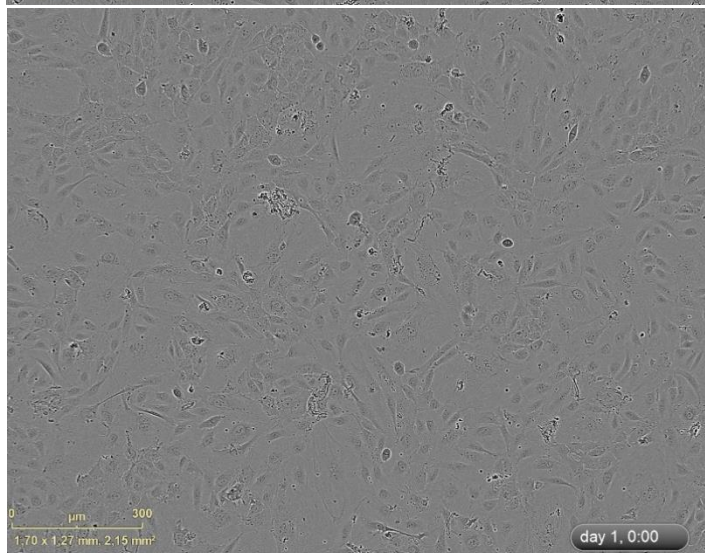
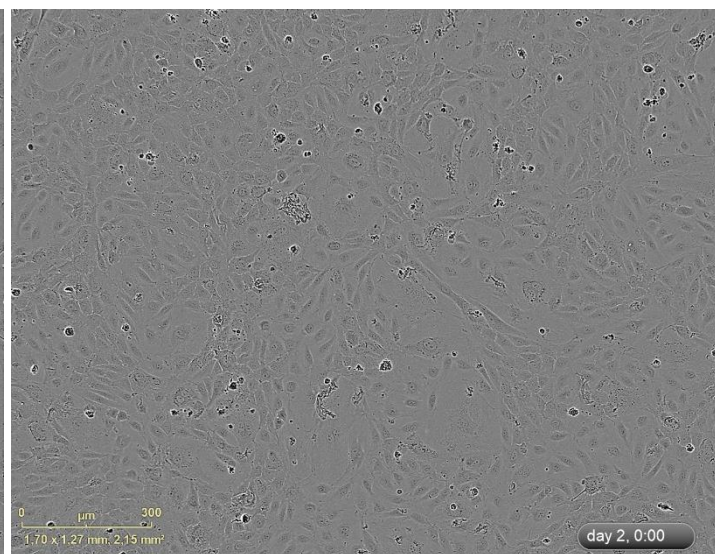


Σχήμα 44: Διαγράμματα της επιφάνειας κυτταρικής κάλυψης (%) συναρτήσει του χρόνου των HUVEC κυττάρων με αντίστοιχη προσθήκη **A)** BTTPD-Th NPs, **B)** IDTDTPD-Ph NPs και **Γ)** IDTDTPD-Th NPs, που χρησιμοποιήθηκαν ως εξεταζόμενα δείγματα σε σύνολο 48h.

A)



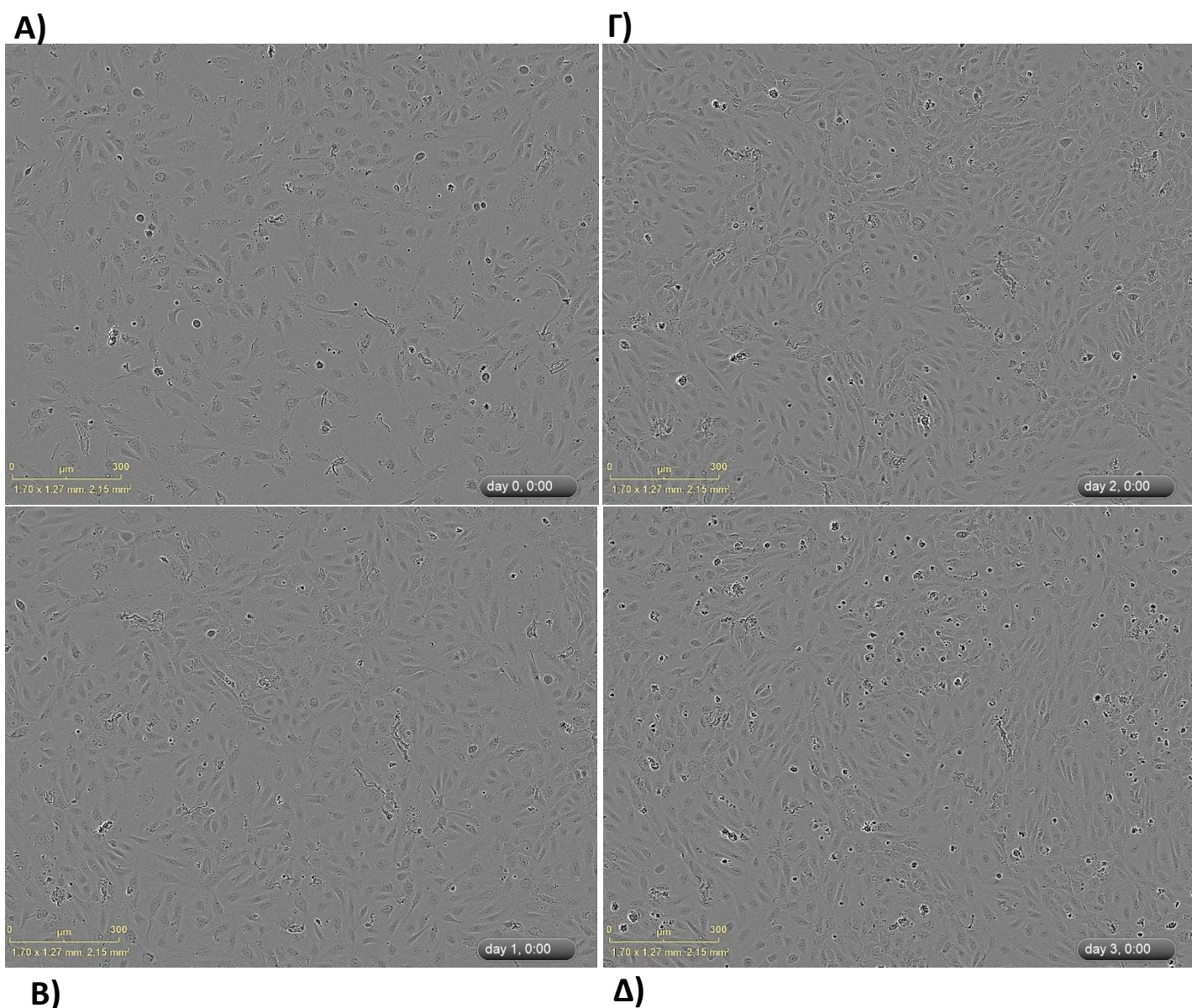
Γ)



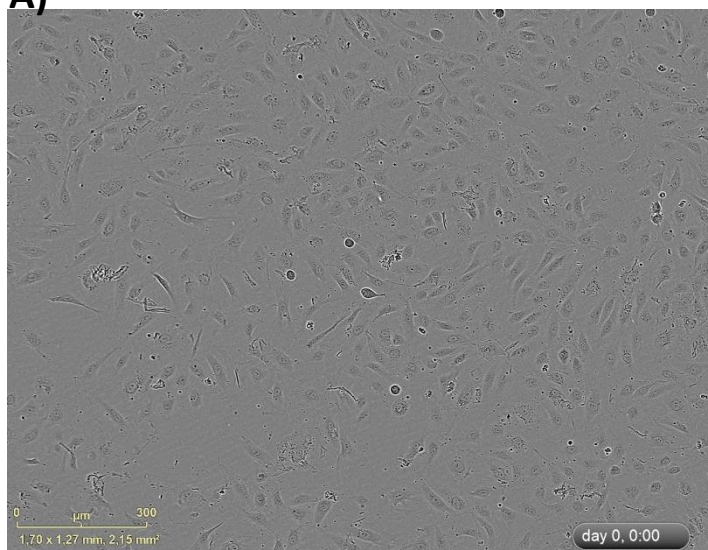
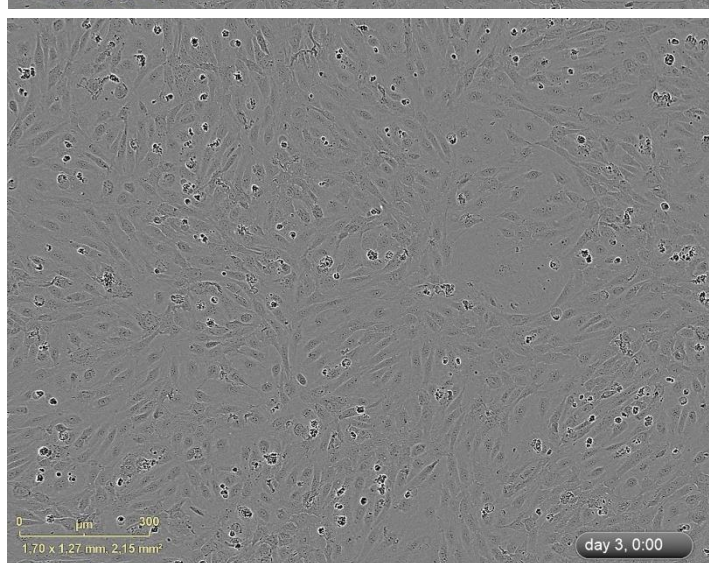
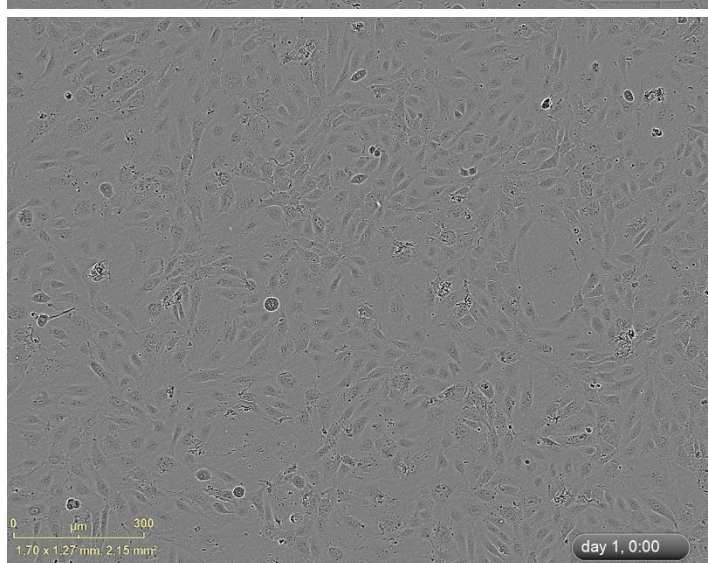
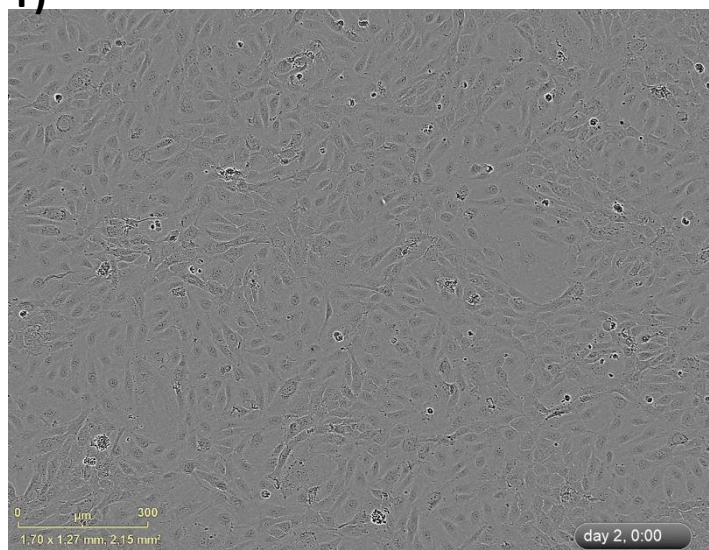
B)

Δ)

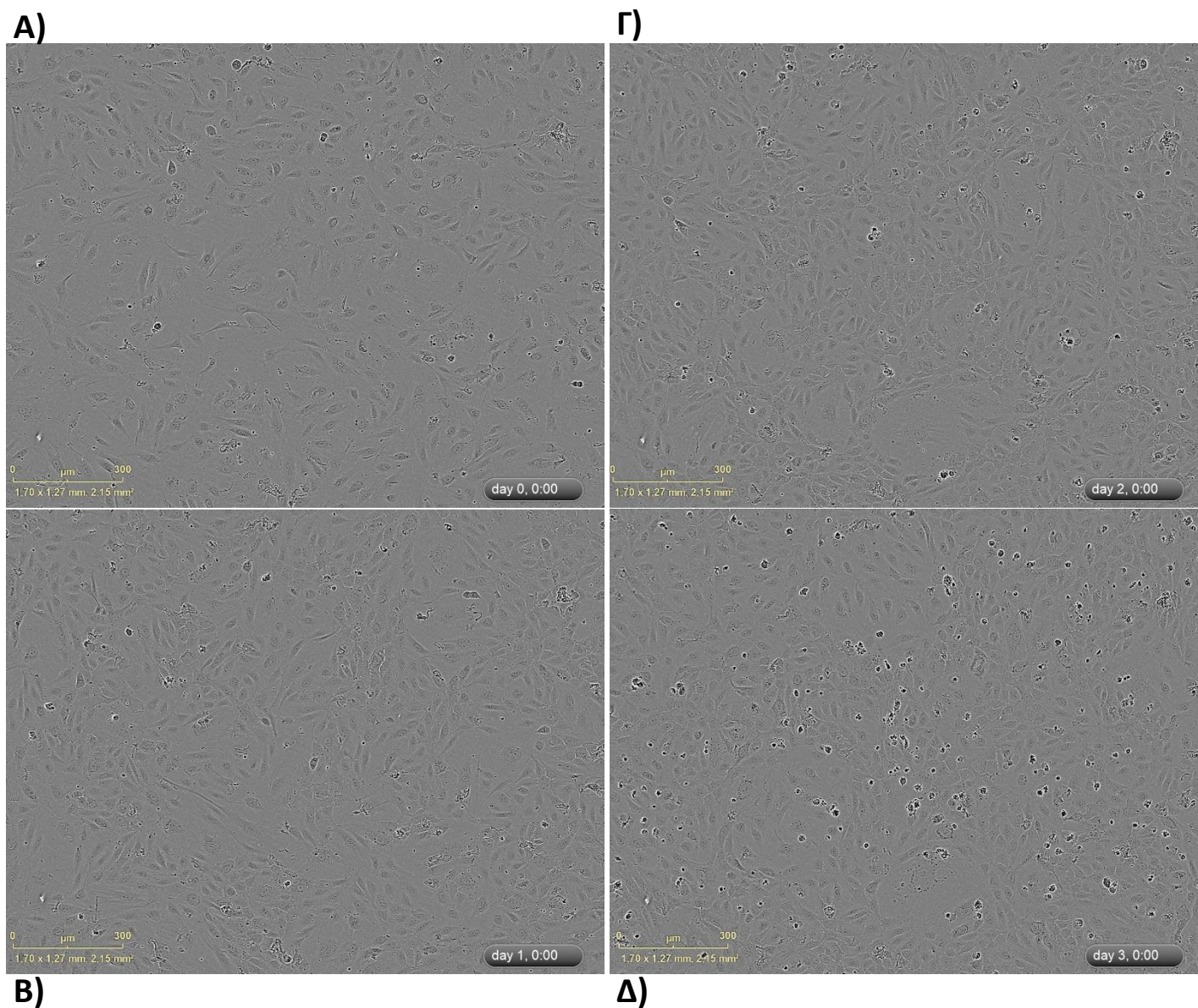
Εικόνα 48: Απεικόνιση HUVECs κυττάρων (control) στην χρονική στιγμή **A)** 0h, **B)** 24h, **Γ)** 48h, **Δ)** 72h.zz



Εικόνα 49: Απεικόνιση HUVECs κυττάρων με προσθήκη BTTPD-Th NPs συγκέντρωσης 0,5μg/ml στην χρονική στιγμή **A)** 0h, **B)** 24h, **Γ)** 48h, **Δ)** 72h.

A)**Γ)****B)****Δ)**

Εικόνα 50: Απεικόνιση HUVECs κυττάρων με προσθήκη IDTDTPD-Ph NPs συγκέντρωσης 0,5μg/ml στην χρονική στιγμή **A)** 0h, **B)** 24h, **Γ)** 48h, **Δ)** 72h.



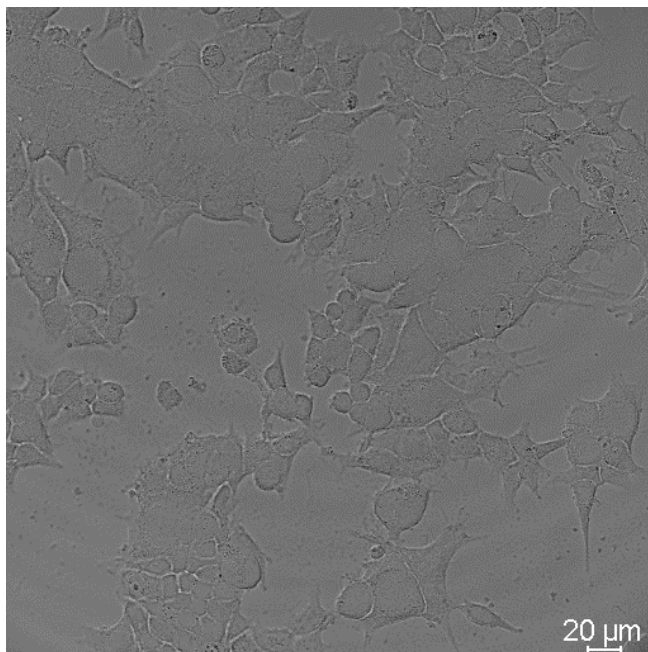
Εικόνα 51: Απεικόνιση HUVECs κυττάρων με προσθήκη IDTDPD-Th NPs συγκέντρωσης 0,5μg/ml στην χρονική στιγμή **A)** 0h, **B)** 24h, **Γ)** 48h, **Δ)** 72h.

6.4.2.: Απεικόνιση των φθοριζόντων NPs μέσω νανοκαταβύθισης σε κύτταρα HCT-116 & HUVECs

Μετά από 24 ώρες επώαση των κυττάρων με τα NPs και τη μονιμοποίηση τους, κάποιες από τις εικόνες που λήφθηκαν μέσω του συνεστιακού μικροσκοπίου φθορισμού (confocal) φαίνονται παρακάτω:

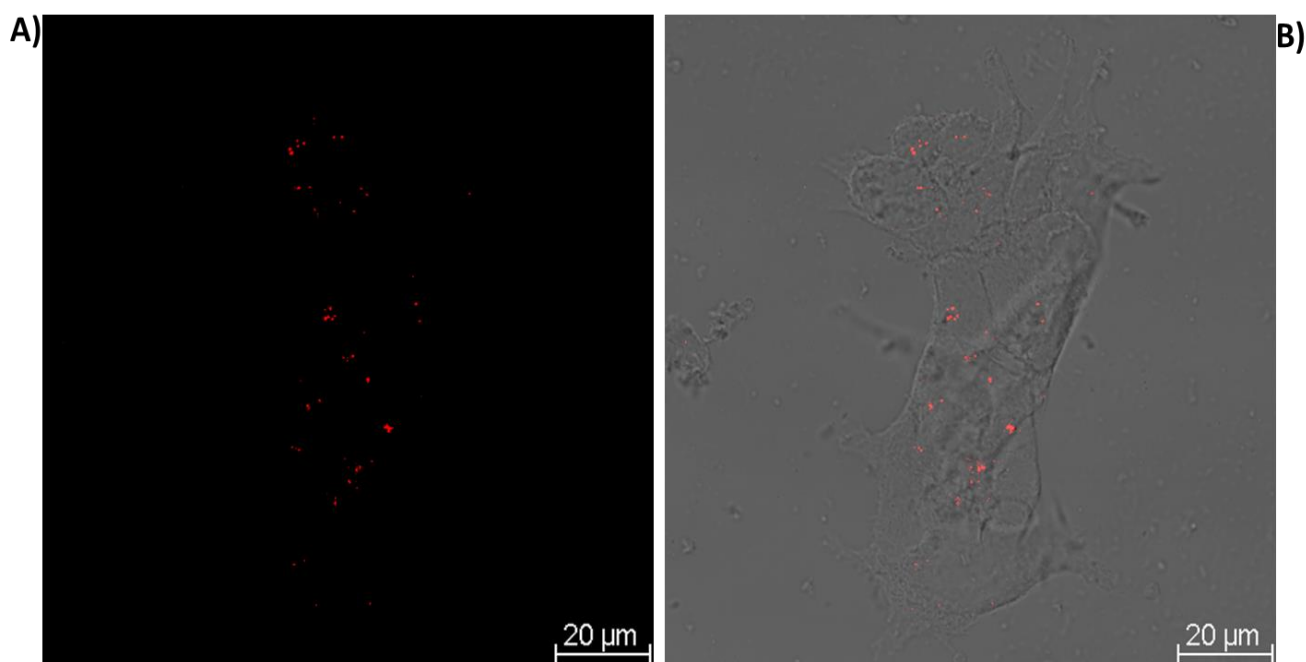
HCT-116

✓ Control



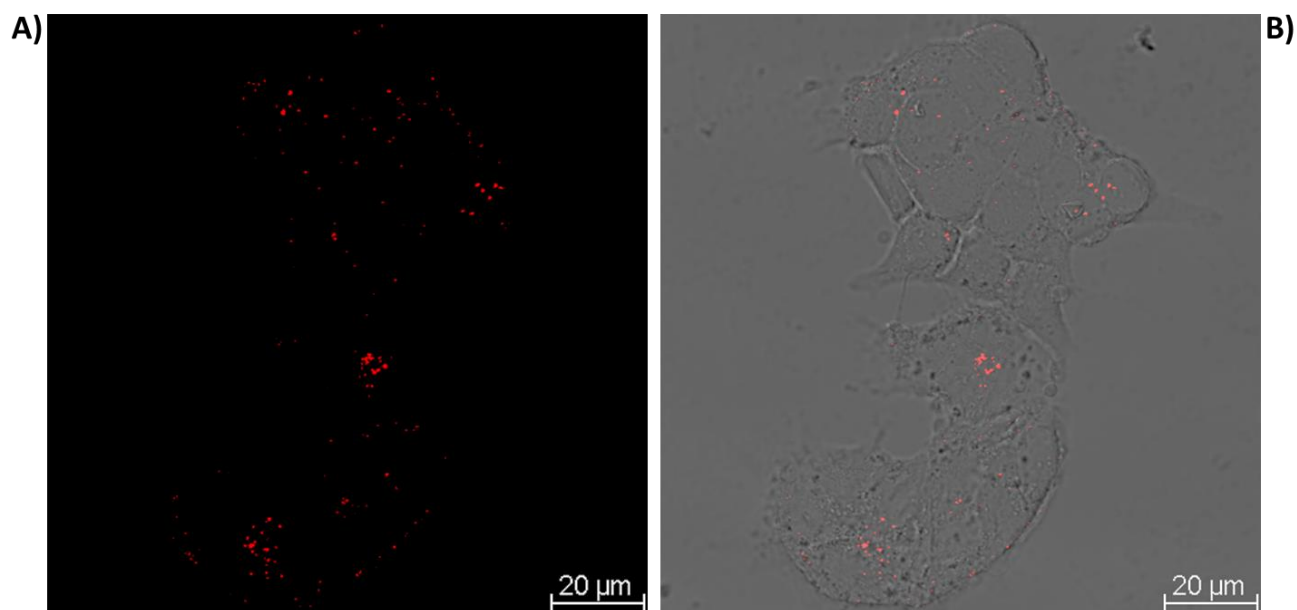
Εικόνα 52: Απεικόνιση περιοχής HCT-116 κυττάρων χωρίς προσθήκη NPs μετά από 24h (control)

✓ BTPD-Th/CPN1



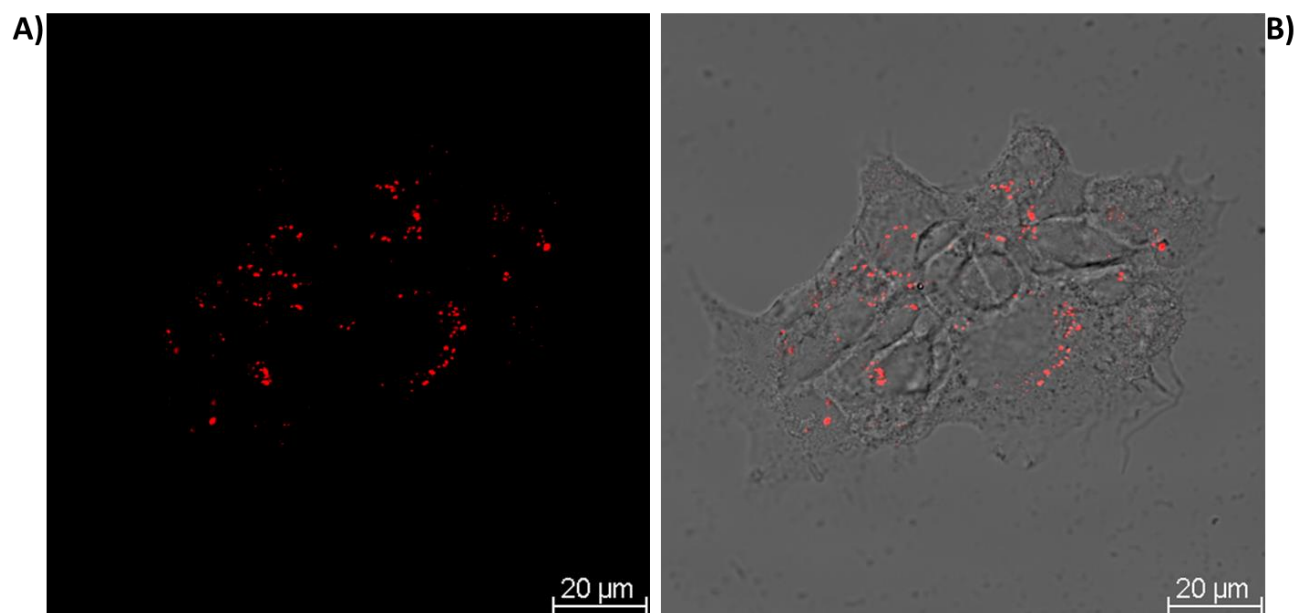
Εικόνα 53: Απεικόνιση περιοχής HCT-116 κυττάρων με προσθήκη BTPD-Th NPs συγκέντρωσης 0,5μg/ml μετά από 24h, όπου **A)** κόκκινης φάσης και **B)** συγχώνευσης με φωτεινό πεδίο της κόκκινης φάσης.

✓ IDTDTPD-Ph/CPN2



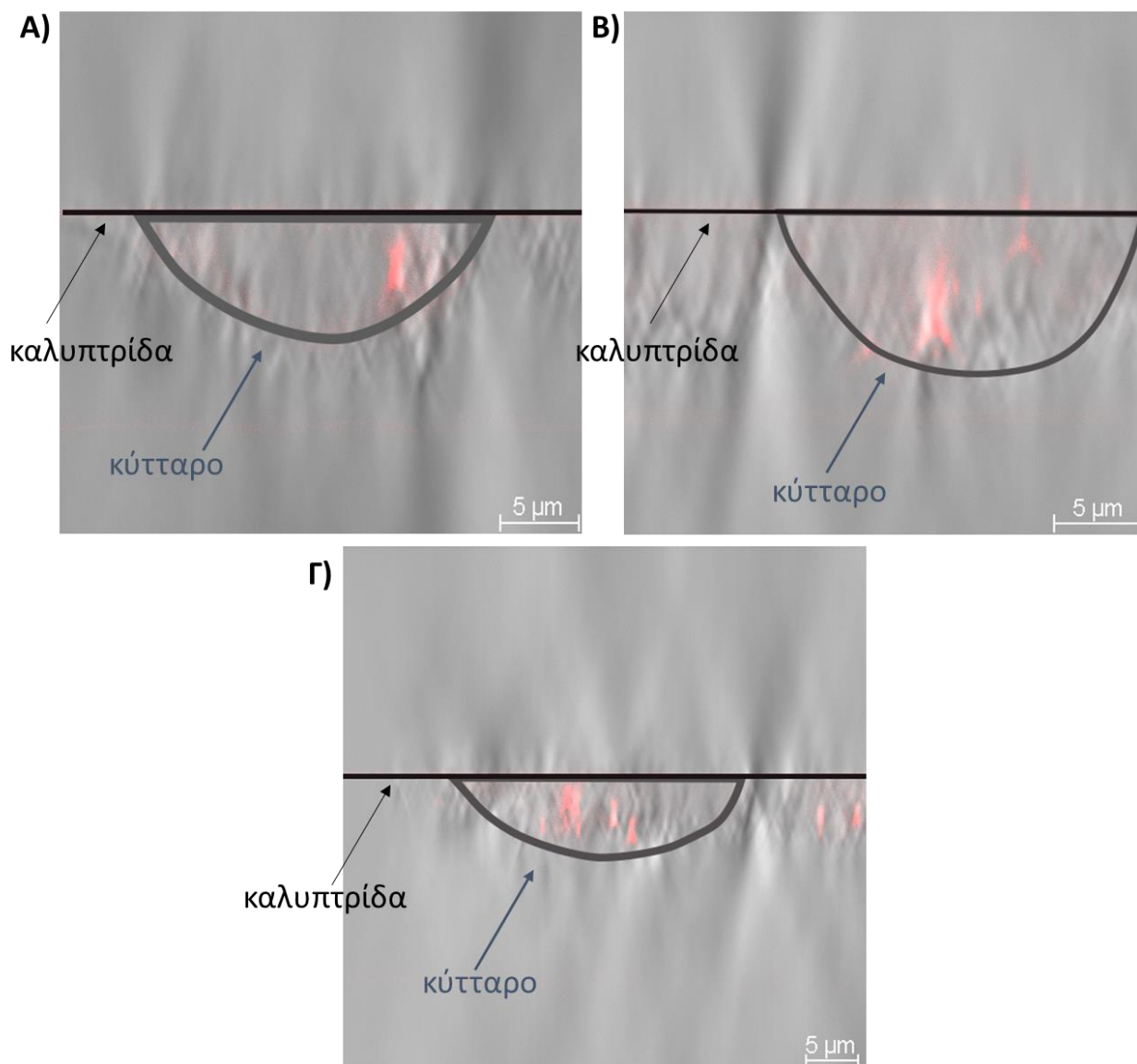
Εικόνα 54: Απεικόνιση περιοχής HCT-116 κυττάρων με προσθήκη IDTDTPD-Ph NPs συγκέντρωσης 0,5µg/ml μετά από 24h, όπου **A)** κόκκινης φάσης και **B)** συγχώνευσης με φωτεινό πεδίο της κόκκινης φάσης.

✓ IDTDTPD-Th/CPN3



Εικόνα 55: Απεικόνιση περιοχής HCT-116 κυττάρων με προσθήκη IDTDTPD-Th NPs συγκέντρωσης 0,5µg/ml μετά από 24h, όπου **A)** κόκκινης φάσης και **B)** συγχώνευσης με φωτεινό πεδίο της κόκκινης φάσης.

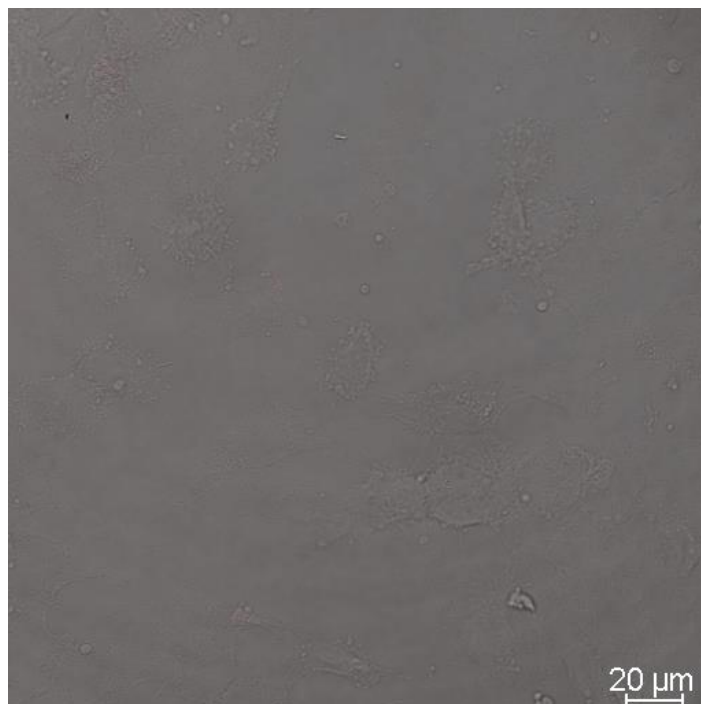
Οι παραπάνω εικόνες μας δείχνουν ότι τα νανοσωματίδια αυτά φθορίζουν με τα κύτταρα HCT-116 και οι παρακάτω εικόνες (Εικόνα 56) που δίνουν την τομή του κυττάρου στο z άξονα, δηλαδή την διχοτόμηση του κυττάρου, επιβεβαιώνουν ότι τα NPs εισέρχονται στα κύτταρα σε συγκέντρωση 0,5μg/ml μετά από 24h.



Εικόνα 56: Διχοτόμηση HCT-116 κυττάρου με NPs **A)** BTPD-Th/CPN1 και **B)** IDTDPD-Ph/CPN2 και **Γ)** IDTDPD-Th/CPN3.

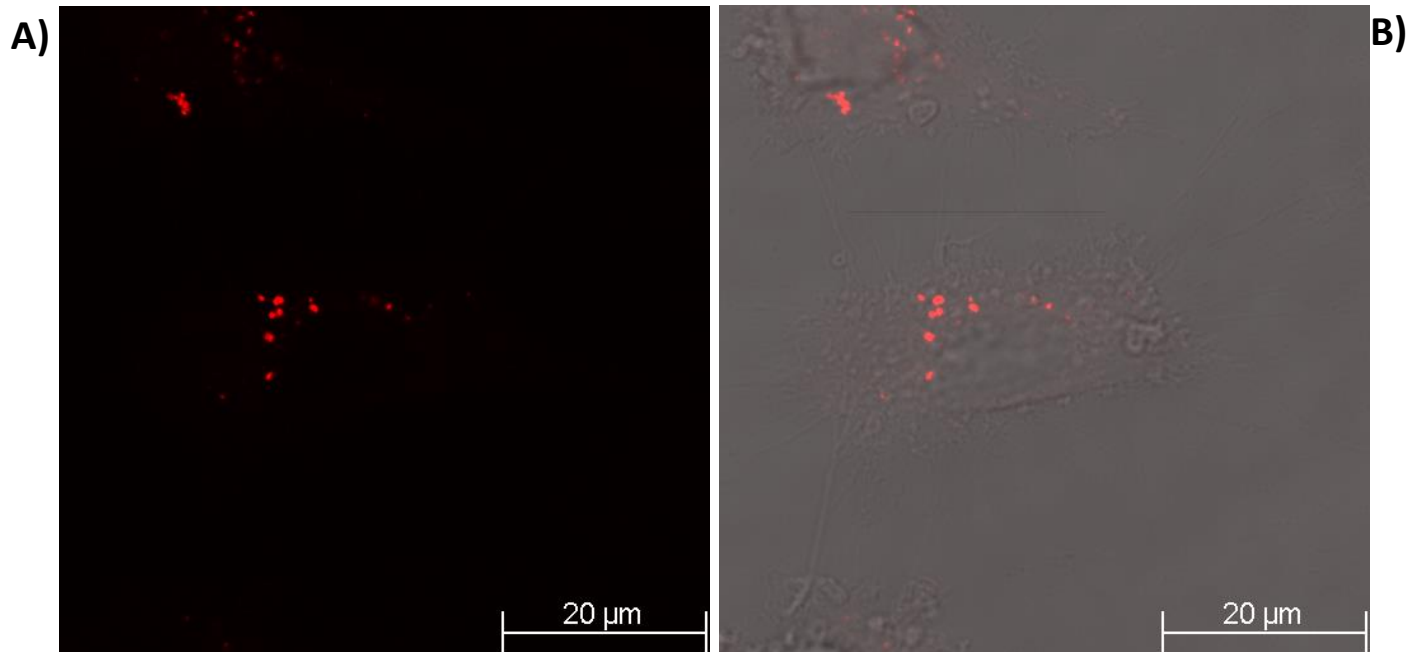
HUVECs

✓ Control



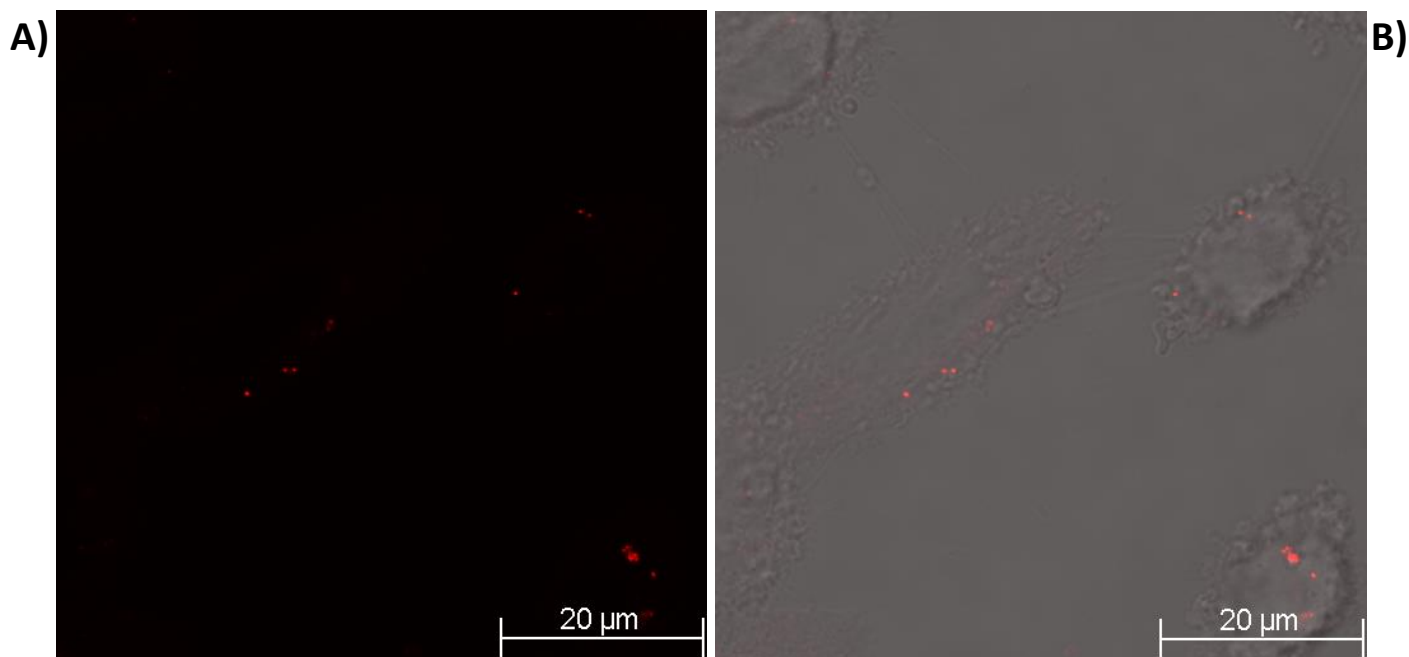
Εικόνα 57: HUVECs που δεν περιέχουν κανένα NP

✓ BTTPD-Th/CPN1



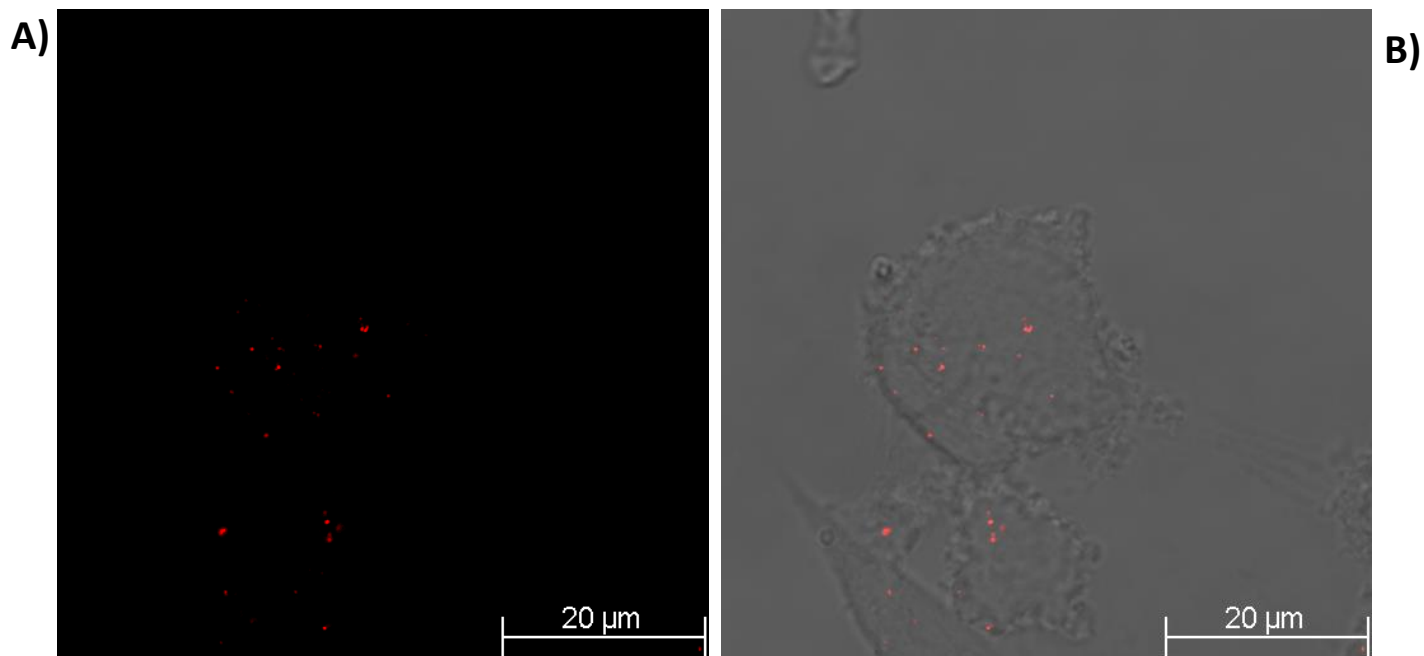
Εικόνα 58: Απεικόνιση περιοχής κυττάρων HUVEC με προσθήκη BTTPD-Th NPs συγκέντρωσης 0,5μg/ml μετά από 24h, όπου **A)** κόκκινης φάσης και **B)** συγχώνευσης με φωτεινό πεδίο της κόκκινης φάσης.

✓ IDTDTPD-Ph/CPN2



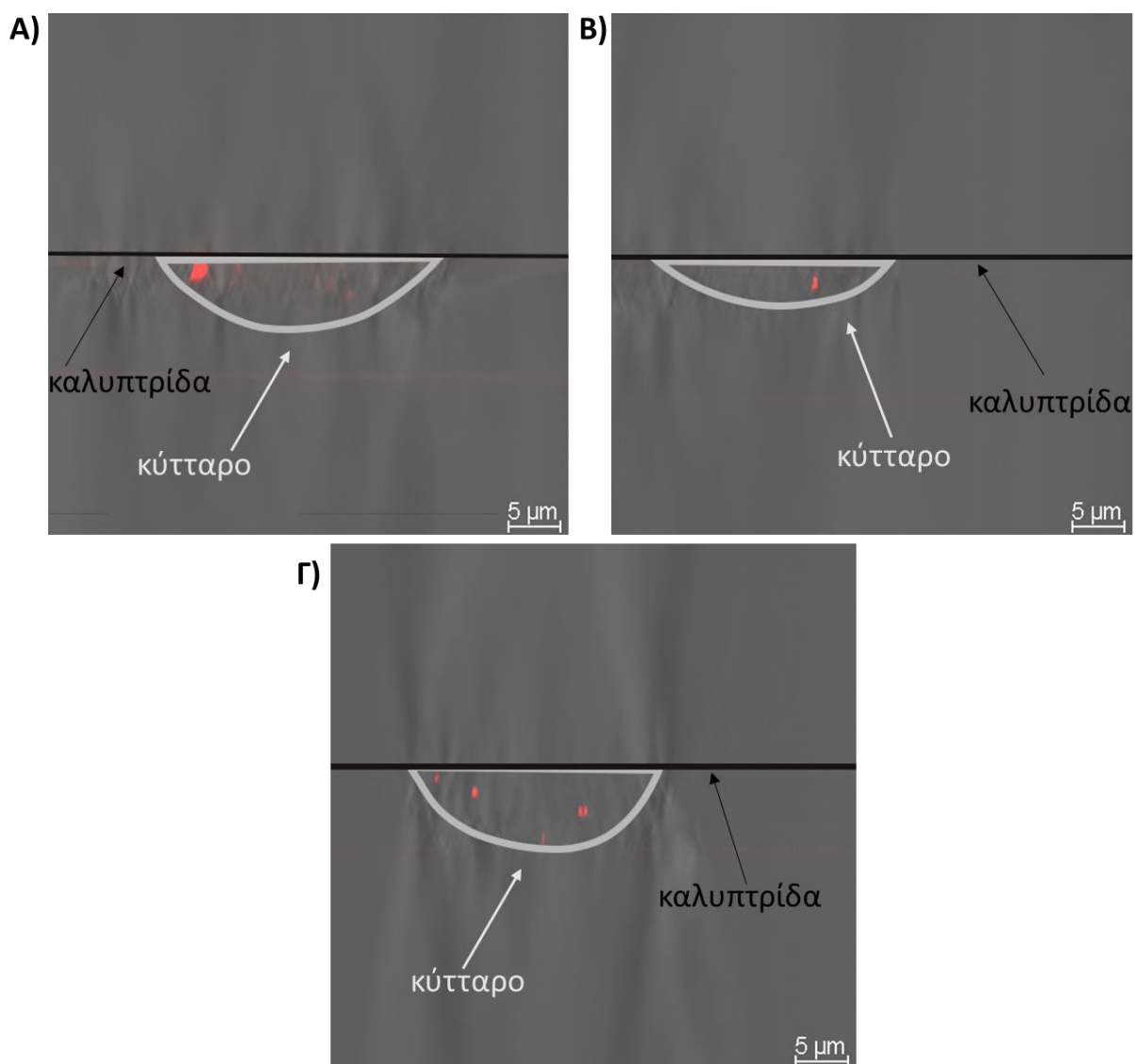
Εικόνα 59: Απεικόνιση περιοχής κυττάρων HUVEC με προσθήκη IDTDTPD-Ph NPs συγκέντρωσης 0,5μg/ml μετά από 24h, όπου **A)** κόκκινης φάσης και **B)** συγχώνευσης με φωτεινό πεδίο της κόκκινης φάσης.

✓ IDTDTPD-Th/CPN3



Εικόνα 60 : Απεικόνιση περιοχής κυττάρων HUVEC με προσθήκη IDTDTPD-Th NPs συγκέντρωσης 0,5μg/ml μετά από 24h, όπου **A)** κόκκινης φάσης και **B)** συγχώνευσης με φωτεινό πεδίο της κόκκινης φάσης.

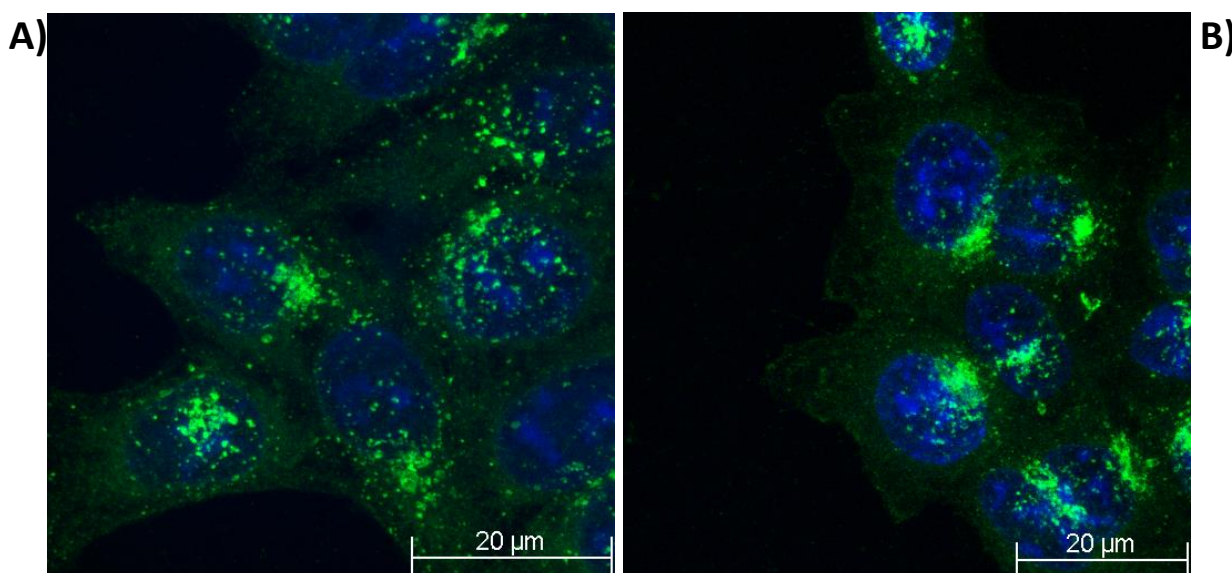
Παρατηρούμε ότι το ίδιο συμβαίνει και στην περίπτωση των HUVECs. Ξανά μέσω της διχοτόμησης, φαίνεται στην εικόνα 61 ότι και σε αυτά εισέρχονται τα νανοσωματίδια μετά από 24h.



Εικόνα 61: Διχοτόμηση HCT-116 κυττάρου με NPs **A)** BTTPD-Th και **B)** IDTDTPD-Ph και **Γ)** IDTDTPD-Th.

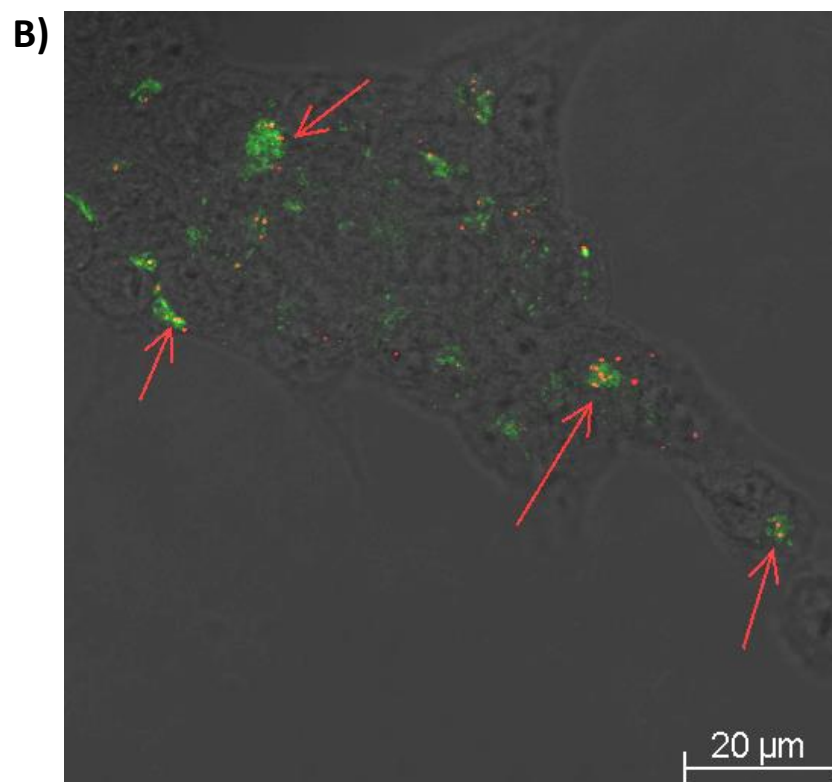
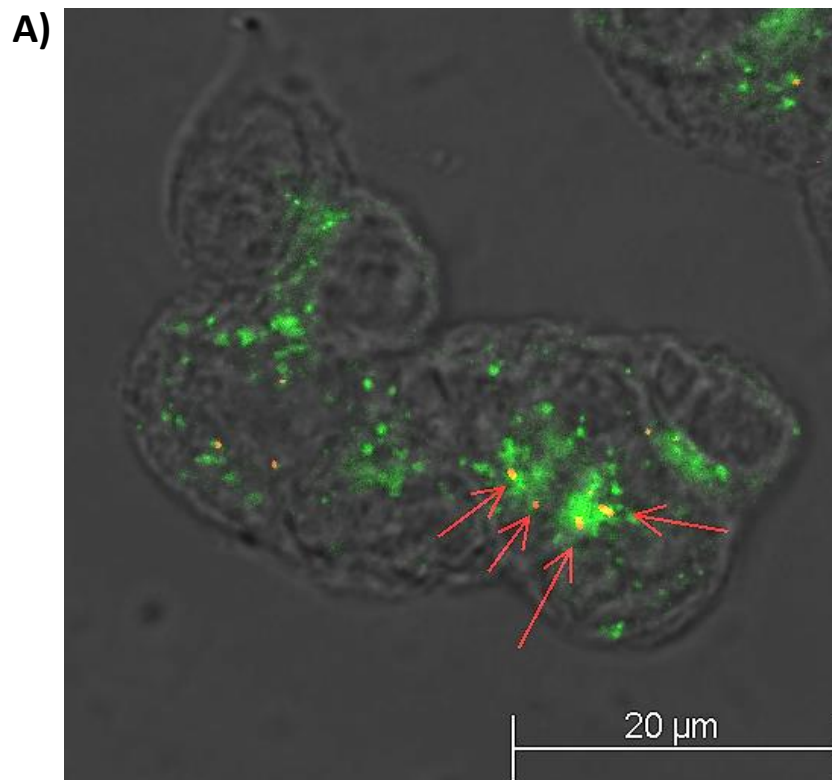
6.4.3.1.: Ανοσοφθορισμός με LAMP1 & CD63 των CPNs σε HCT-116 ύστερα από 24h επώασης

Αρχικά, θα παρουσιαστούν κάποιες εικόνες για τον έλεγχο των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία. Ο έλεγχος αυτός έγινε για να διαπιστωθεί η καλή λειτουργία αυτών. Το αντίσωμα LAMP1⁶⁵ χρωματίζει με πράσινο τα λυσοσώματα του κυττάρου, ενώ το CD63⁶⁶ με πράσινο τα πολυκυστιδιακά σωμάτια. Στον έλεγχο αυτόν έχει προστεθεί και χρωστική που βάφει μπλε τον πυρήνα και πιο συγκεκριμένα η DRAQ5 (σε αναλογία 1:1000).

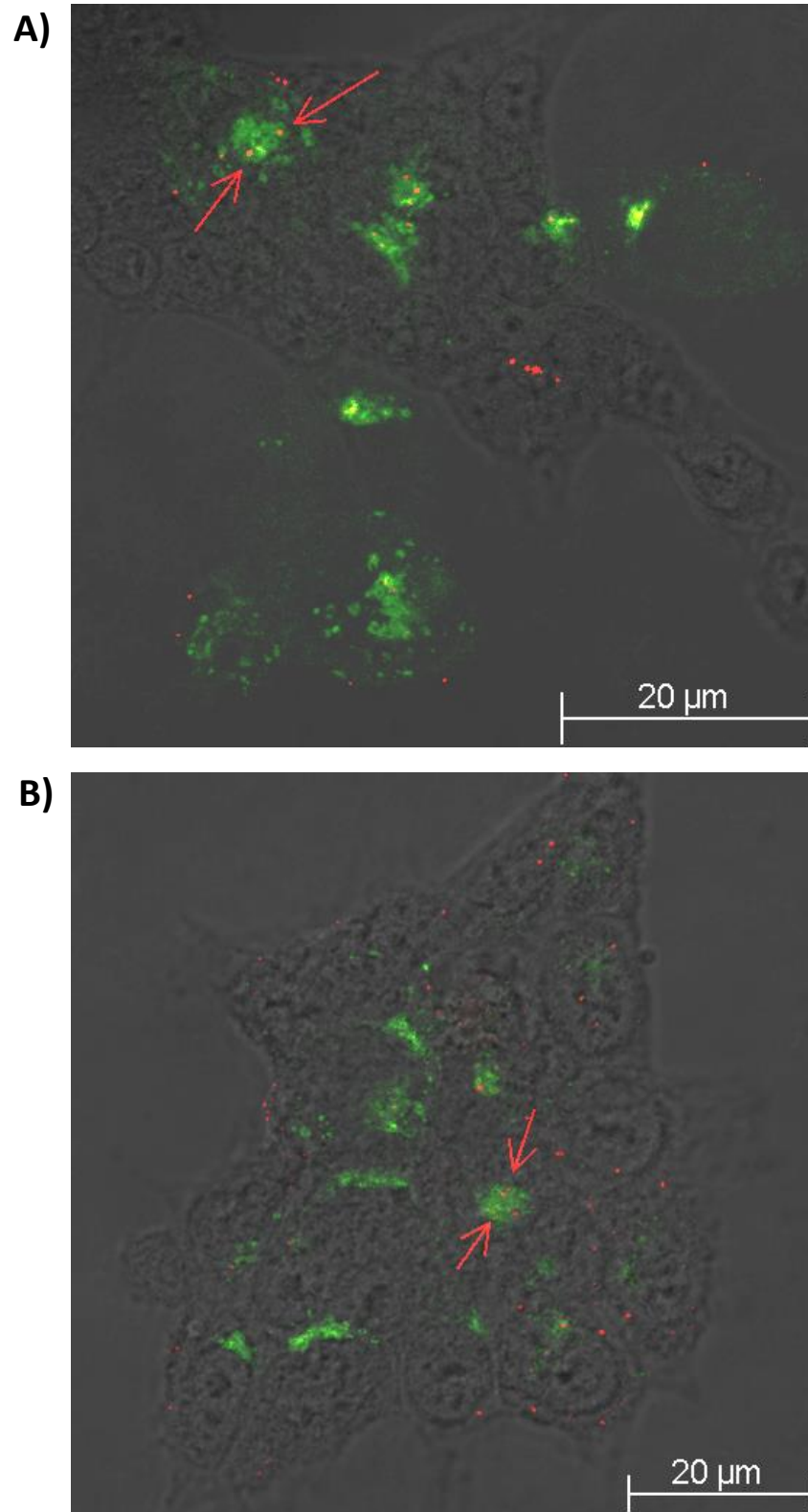


Εικόνα 62: Ανοσοφθορισμός HCT-116 κυττάρων (*maximum projection*) με **A)** LAMP1 και **B)** CD63.

Όταν προστέθηκαν και τα νανοσωματίδια παρατηρήθηκε συνεντοπισμός αυτών μαζί με τα λυσοσώματα αλλά και τα πολυκυστιδιακά σωμάτια. Η μόνη διαφορά παρατηρήθηκε στο CPN2, το οποίο φαίνεται να εισέρχεται τελικά στο κύτταρο σε πολύ μικρότερο ποσοστό νανοσωματιδίων απ' ό,τι τα CPN1 και CPN3. Το ποσοστό του CPN2 που καταφέρνει να εισαχθεί ακολουθεί την ίδια τακτική, δηλαδή εντοπίζεται στα λυσοσώματα, καθώς και τα πολυκυστιδιακά σωμάτια. Ωστόσο, όπως φαίνεται παρακάτω, υπάρχουν και NPs του CPN2 που βρίσκονται εκτός του κυττάρου. Οι παρατηρήσεις αυτές είναι εμφανείς στις εικόνες που ακολουθούν (Εικόνες 63, 64, 65).

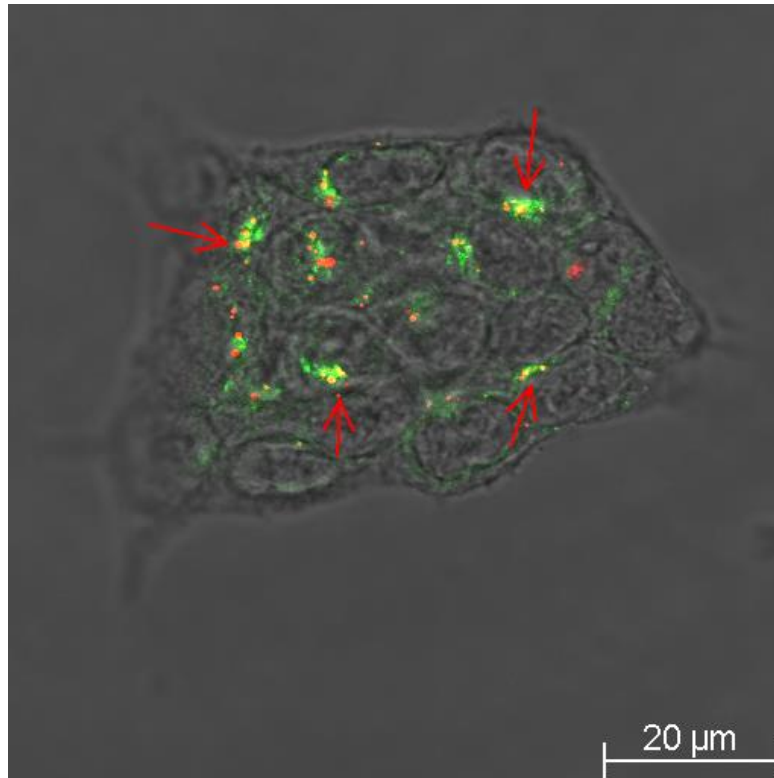


Εικόνα 63: Ανοσοφθορισμός HCT-116 κυττάρων επωασμένα με BTTPD-Th NPs για 24h και χρώση με **A)** LAMP1 και **B)** CD63.

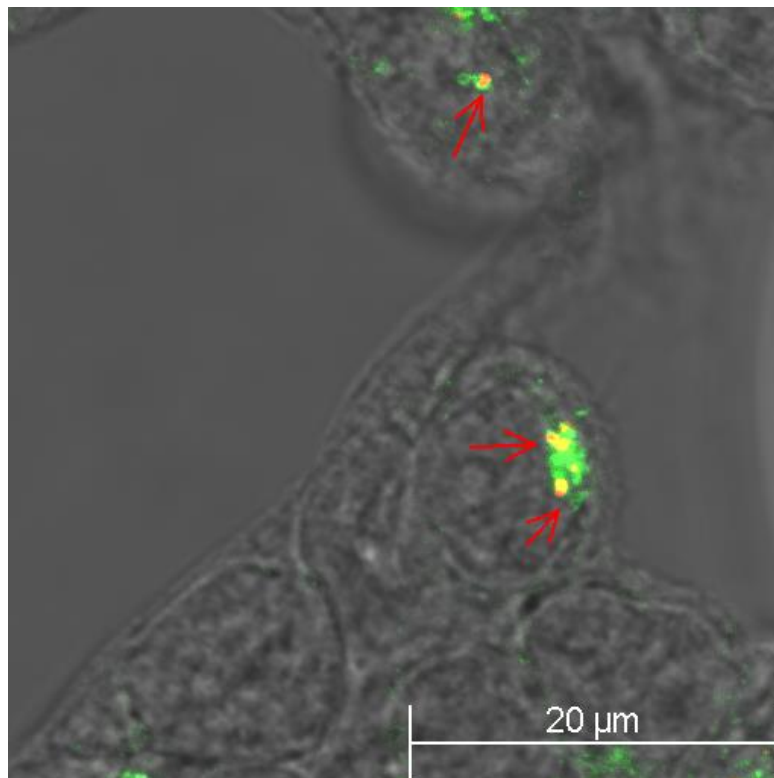


Εικόνα 64: Ανοσοφθορισμός HCT-116 κυττάρων επωασμένα με IDTDTPD-Ph NPs για 24h και χρώση με **A)** LAMP1 και **B)** CD63.

A)



B)

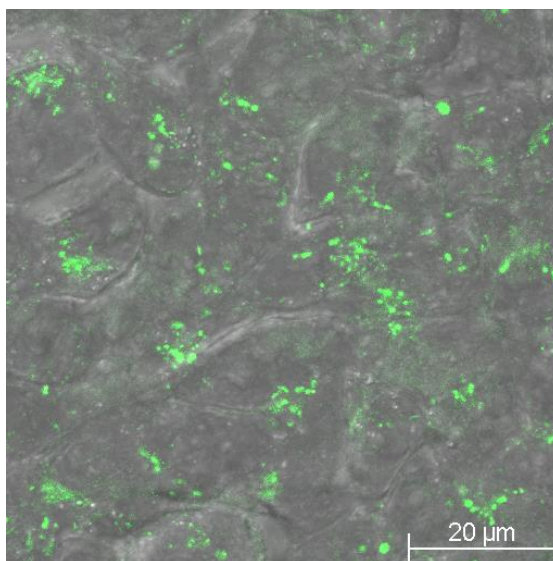


Εικόνα 65: Ανοσοφθορισμός HCT-116 κυττάρων επωασμένα με IDTDTPD-Th NPs για 24h και χρώση με **A)** LAMP1 και **B)** CD63.

6.4.3.2.: Ζωντανή Συνεστιακή Μικροσκοπία Φθορισμού HCT-116 με χρήση χρωστικής Lucifer Yellow και τα NPs μέσω νανοκαταβύθισης

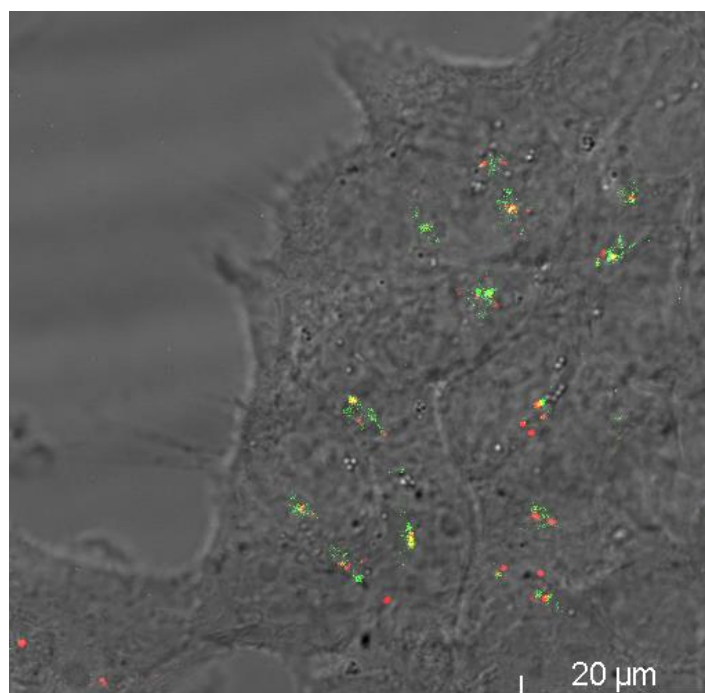
Έγινε για έναν δεύτερο έλεγχο και ζωντανή απεικόνιση των κυττάρων HCT-116 με τα CPNs και χρωματισμός των λυσοσωμάτων με τη χρωστική Lucifer Yellow. Αυτή η μέθοδος επιβεβαίωσε αρχικά τα προηγούμενα αποτελέσματα, αλλά και έδειξε ότι δεν προκαλείται κάποια καταστροφή ή αλλοίωση στα λυσοσώματα παρουσία CPNs. Παρακάτω φαίνονται κάποιες ενδεικτικές εικόνες που δείχνουν τις παραπάνω παρατηρήσεις.

✓ Control



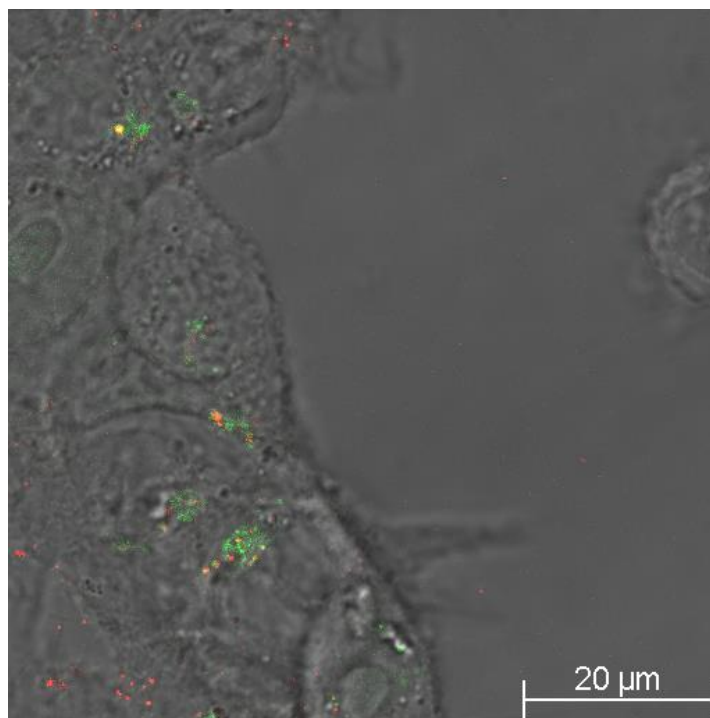
Εικόνα 66: Απεικόνιση HCT-116 κυττάρων με χρωστική Lucifer Yellow σε maximum projection.

✓ **BTTPD-Th/CPN1**



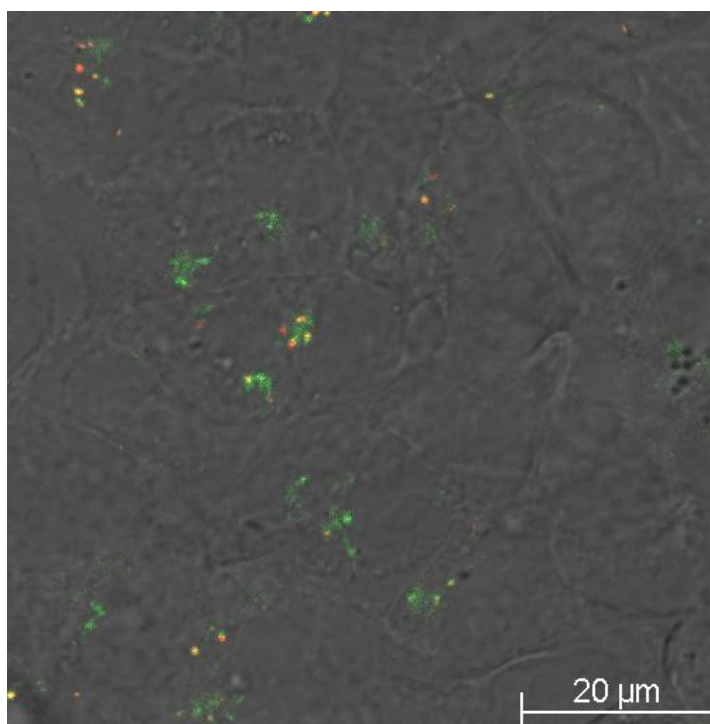
Εικόνα 67: Απεικόνιση HCT-116 κυττάρων με χρωστική Lucifer Yellow & BTTPD-Th NPs.

✓ IDTDTPD-Ph/CPN2



Εικόνα 68: Απεικόνιση HCT-116 κυττάρων με χρωστική Lucifer Yellow & IDTDTPD-Ph NPs.

✓ IDTDTPD-Th/CPN3

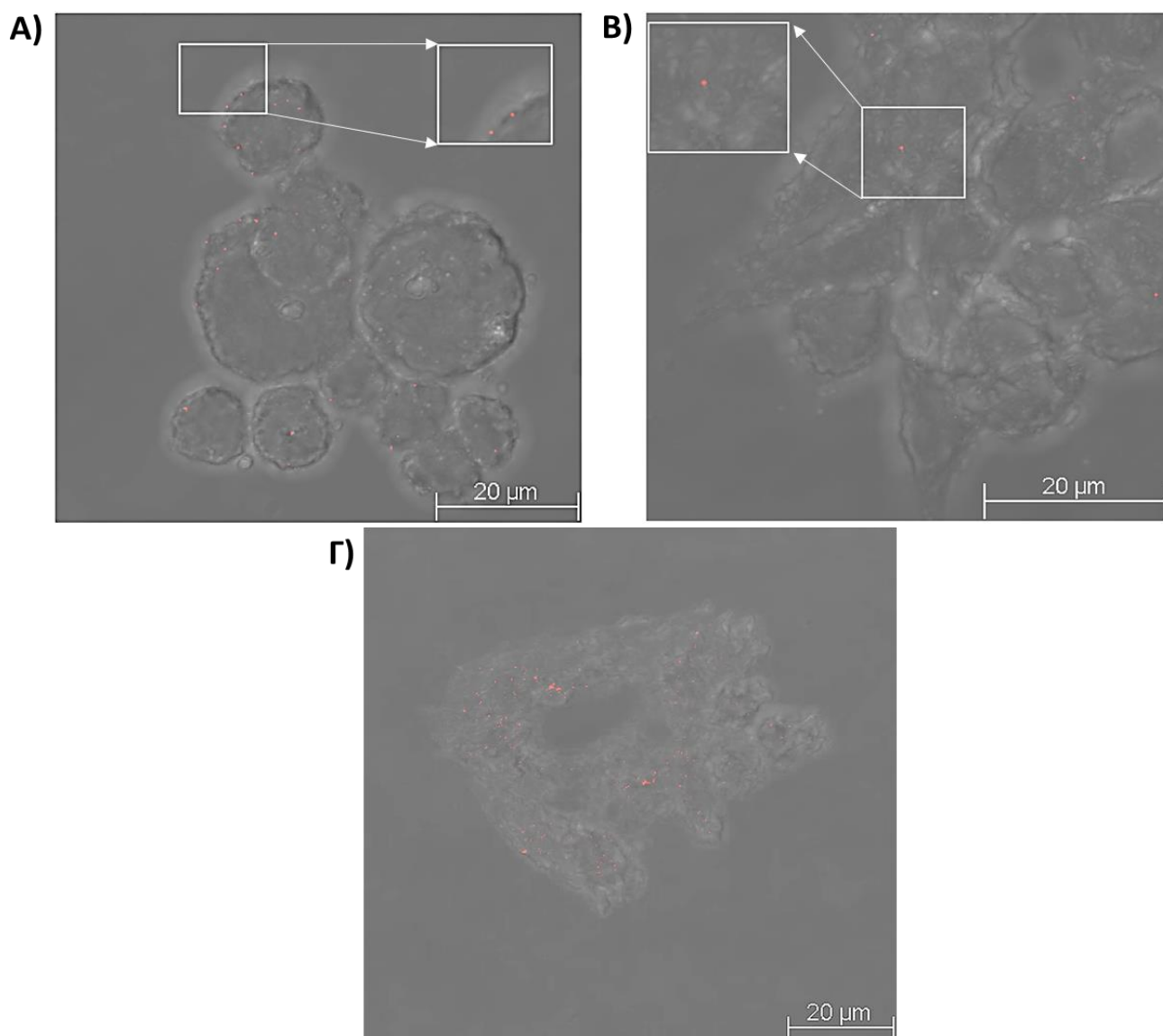


Εικόνα 69: Απεικόνιση HCT-116 κυττάρων με χρωστική Lucifer Yellow & IDTDTPD-Th NPs.

6.4.3.3.: Χρονικός προσδιορισμός εισαγωγής των NPs μέσω νανοκαταβύθισης στα κύτταρα HCT-116

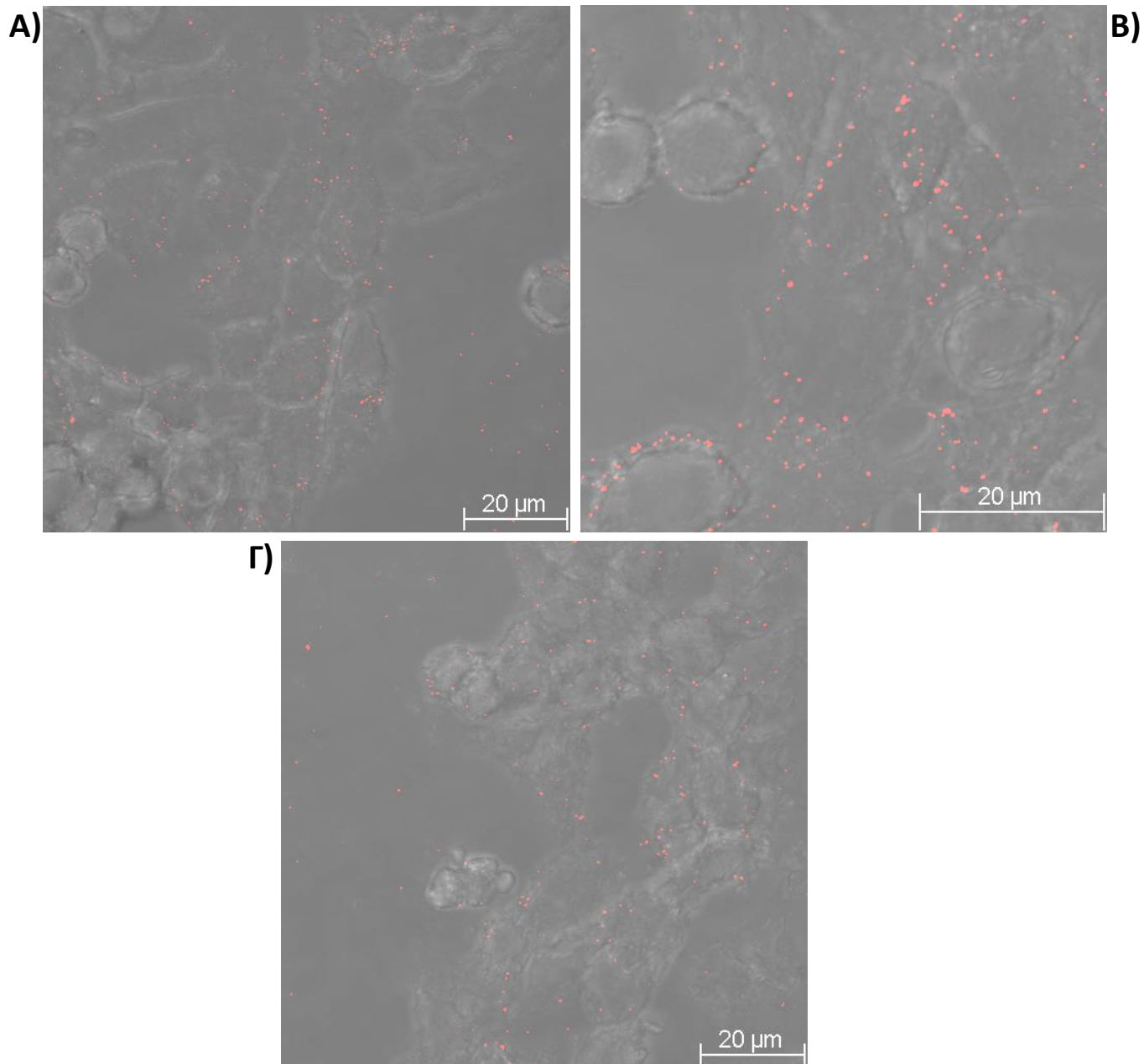
Επιπρόσθετα, έγινε προσδιορισμός για την χρονική στιγμή κατά την οποία το κάθε είδος νανοκαταβυθιζόμενων NPs αρχίζει να εισέρχεται μέσα στα καρκινικά κύτταρα HCT-116. Δοκιμάστηκαν διάφοροι χρόνοι επώασής τους σε συγκέντρωση 0,5μg/ml, όπου μετά το πέρας των χρόνων αυτών έγινε μονιμοποίηση και προβολή στο συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού (confocal). Οι χρόνοι αυτοί ήταν 15, 30, 45, 60 και 90 λεπτά για αρχή, όπου δεν φάνηκε να έχουμε NPs μέσα στα κύτταρα. Στην συνέχεια δοκιμάστηκαν 2,4 και 6 ώρες, όπου διαπιστώθηκε ότι στη χρονική στιγμή των 6 ωρών, φαίνονται ένα ποσοστό των NPs να έχουν εισέρθει μέσα στα κύτταρα. Αυτά τα αποτελέσματα ισχύουν και για τα τρία εξεταζόμενα πολυμερή της παρούσας διπλωματικής εργασίας με μορφή νανοσωματιδίων με την μέθοδο της νανοκαταβύθισης. Παρ' όλα αυτά, ακολουθεί παρακάτω μία μικρή ανάλυση των αποτελεσμάτων αυτών για τα 3 nanoprecipitated NPs για τις χρονικές στιγμές 2, 4 και 6 ώρες.

➤ BTTPD-Th/CPN1

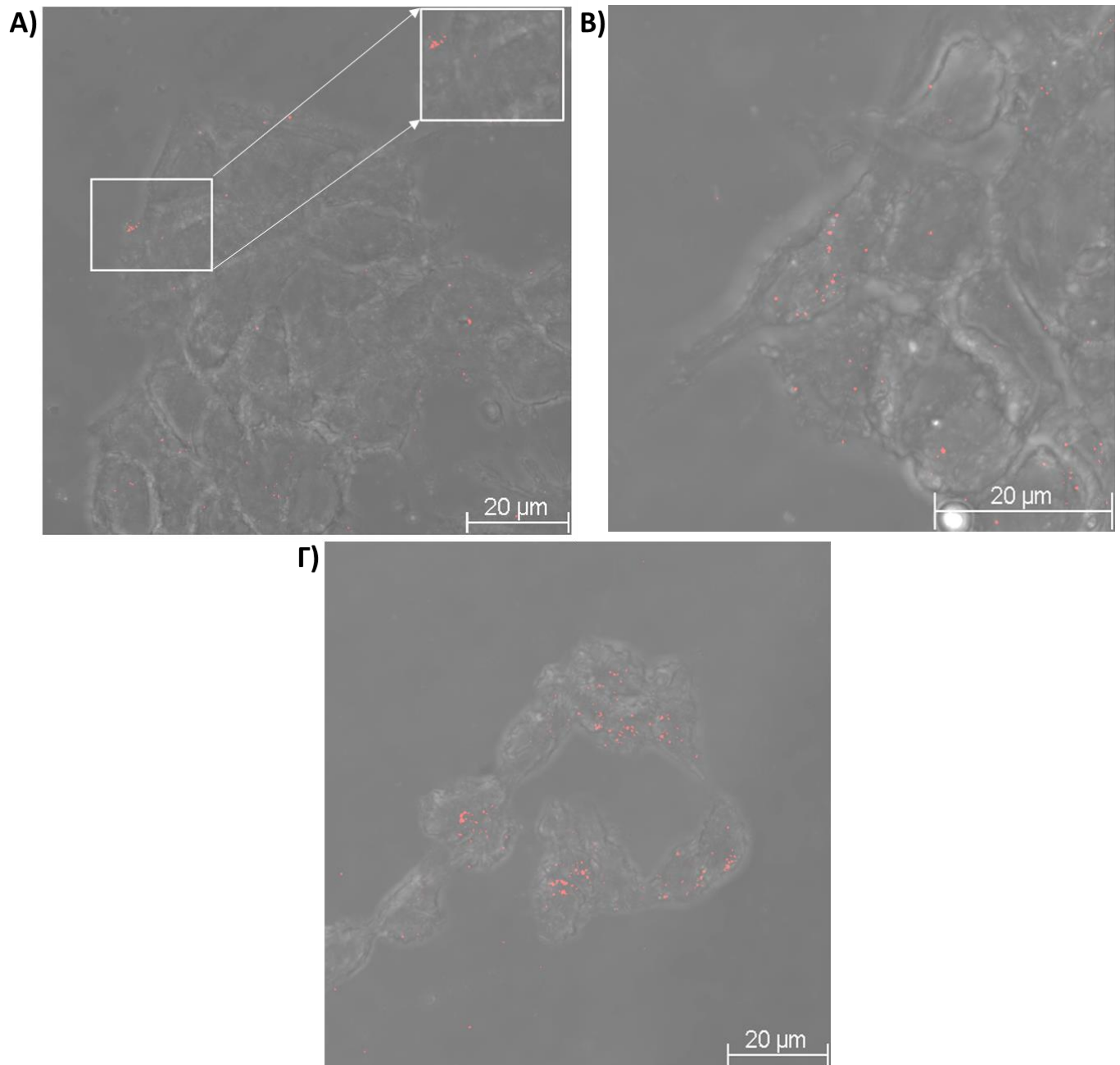


Εικόνα 70 : Απεικόνιση HCT-116 κυττάρων με BTTPD-Th NPs για **A)2h, B)4h** και **Γ)6h** επώασης.

✓ IDTDTPD-Ph/CPN2



Εικόνα 71: Απεικόνιση HCT-116 κυττάρων με IDTDTPD-Ph NPs για **A)2h**, **B)4h** και **Γ)6h**



Εικόνα 72: Απεικόνιση HCT-116 κυττάρων με IDTDTPD-Th NPs για **A)**2h, **B)**4h και **Γ)**6h επώασης.

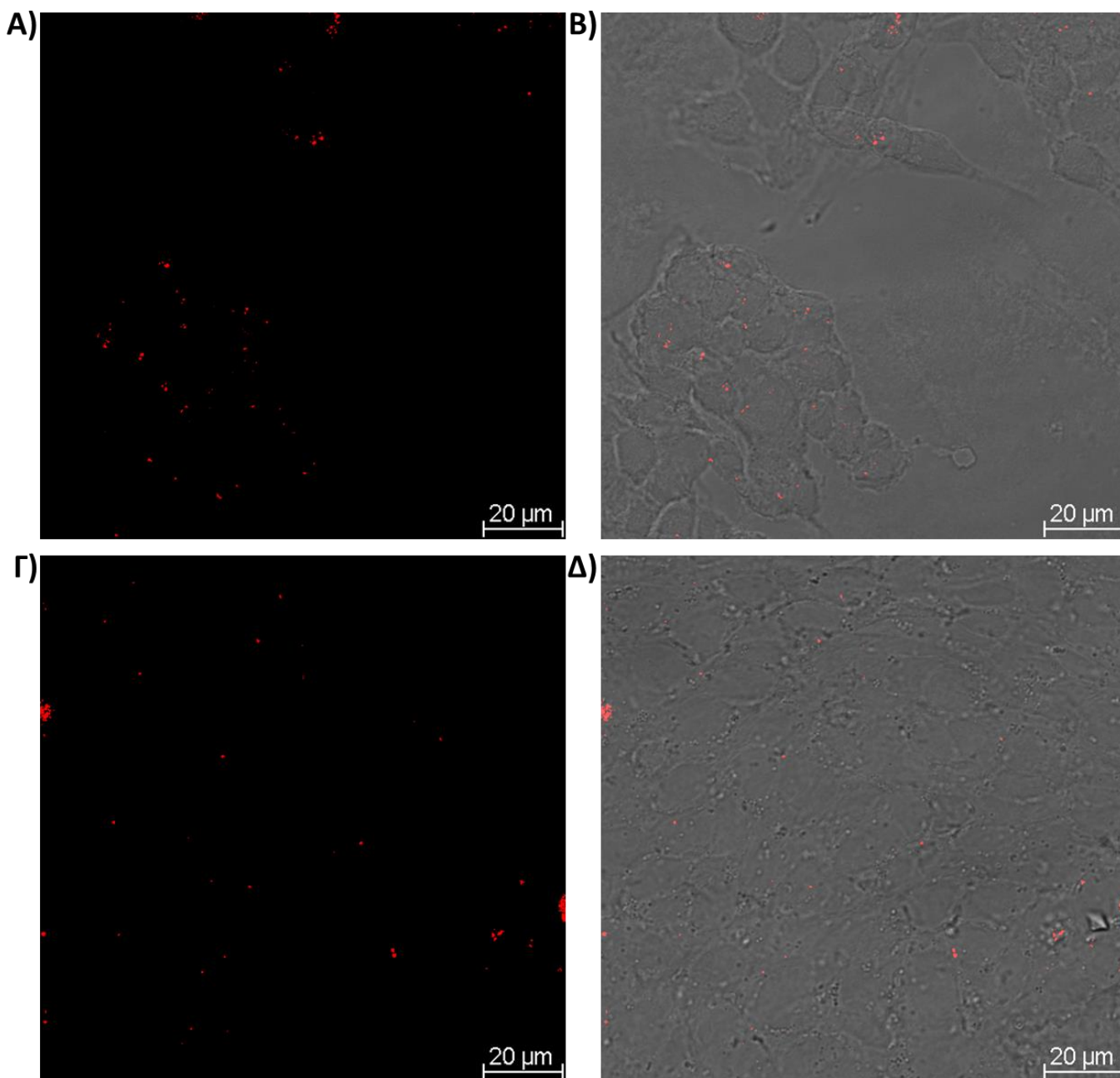
Ενώ αρχίζουν και φαίνονται τα κάποια NPs στις 2h, δεν βρίσκονται μέσα στα κύτταρα. Οι παραπάνω εικόνες είναι μια μέγιστη προβολή από όλα τα επίπεδα του κυττάρου. Παρατηρήθηκε ότι τα NPs αυτά που αρχίζουν να φαίνονται και δεν έφυγαν από τις πλύσεις κατά τη διάρκεια της μονιμοποίησης, βρίσκονται πάνω στα κύτταρα ή κολλημένα στην κυτταρική μεμβράνη. Το ίδιο ισχύει και για την περίπτωση των 4h με την διαφορά ότι αρχίζουν να εμφανίζονται περισσότερα NPs, τα οποία είναι κυρίως έξω ή πάνω από τα κύτταρα και ελάχιστα φαίνονται να είναι εντός. Στις 6h εντοπίζονται και τα τρία CPNs να βρίσκονται σε μεγαλύτερο ποσοστό εντός των κυττάρων, πράγμα που σημαίνει ότι αυτό το χρονικό διάστημα χρειάζονται τα νανοσωματίδια για να εισέρθουν στα HCT-116 κύτταρα.

6.4.3.4.: Έκκριση (Secretion)

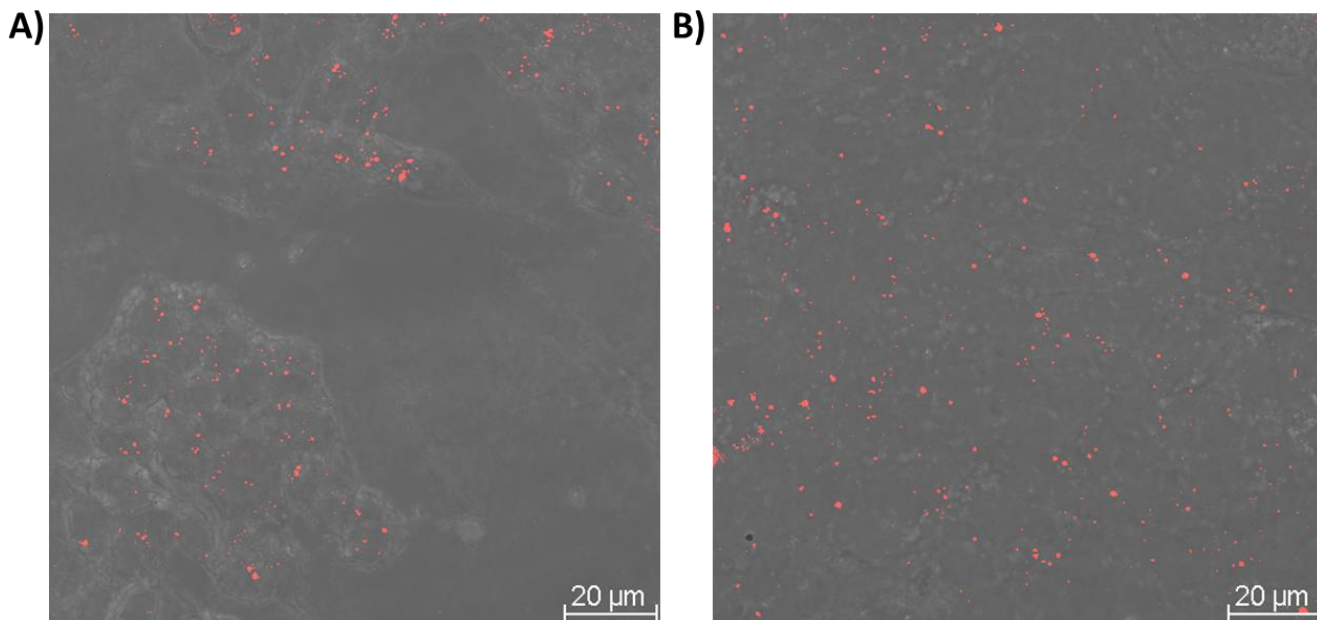
Η έκκριση στα κύτταρα είναι η κίνηση του υλικού από το ένα σημείο στο άλλο, όπως μια εκκρινόμενη χημική ουσία από ένα κύτταρο ή αδένα. Αντιθέτως, η απέκκριση είναι η απομάκρυνση ορισμένων ουσιών ή απορριμμάτων από ένα κύτταρο.

Παρακάτω ακολουθεί παρουσίαση φωτογραφιών, που λήφθηκαν μέσω του συνεστιακού μικροσκοπίου φθορισμού (confocal), των κυττάρων HCT-116 μαζί με τα CPNs στις 24h και 96h επώασης αυτών με τα κύτταρα.

➤ BTTPD-Th/CP1



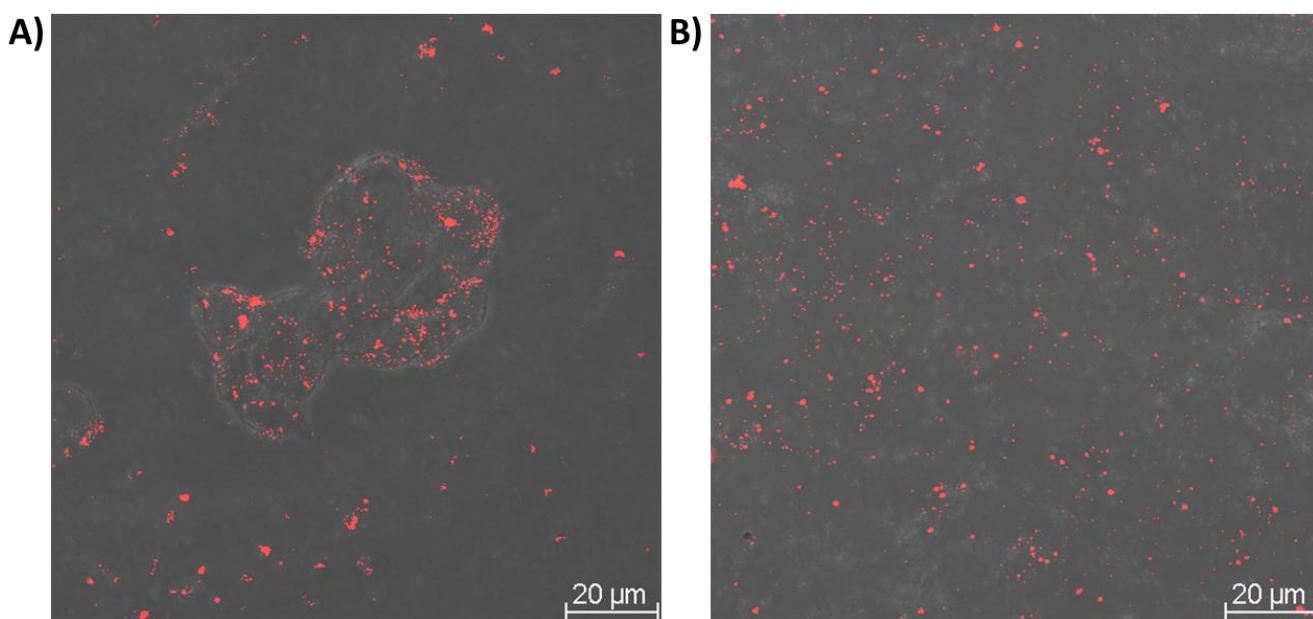
Εικόνα 73: Απεικόνιση HCT-116 κυττάρων με BTTPD-Th NPs για επώαση **A)** 24h κόκκινης φάσης, **B)** 24h συγχώνευσης με φωτεινό πεδίο, **Γ)** 96h κόκκινης φάση και **Δ)** 96h συγχώνευσης με φωτεινό πεδίο.



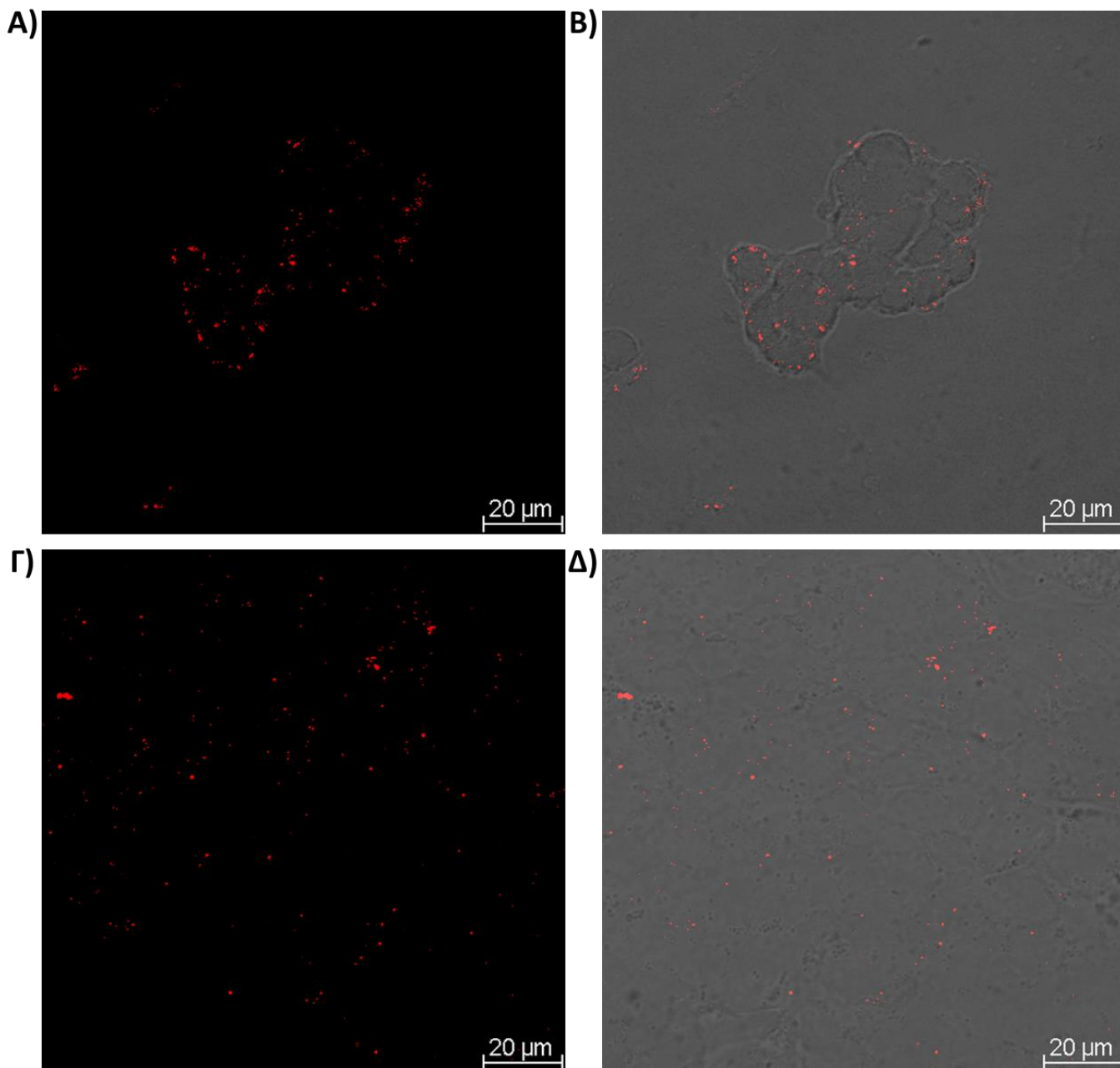
Εικόνα 74: Απεικόνιση (*maximum projection*) HCT-116 κυττάρων με BTTPD-Th NPs για **A)**24h και **B)**96h επώασης.

Από την εικόνα 73, όπου απεικονίζεται ενδεικτικά ένα κομμάτι της περιοχής αυτής στην κόκκινη φάση αλλά και σε συνδυασμό της με το φωτεινό πεδίο στις 24 και 96 ώρες, φαίνεται ότι τα NPs μετά από 4 μέρες έχουν εισέρθει στα κύτταρα και παραμένουν εκεί καθώς τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται κανονικά. Τα κύτταρα στα οποία έχουν εισέρθει δεν φαίνονται να αποβάλλουν τα NPs σε αυτό το χρονικό διάστημα και το σήμα φθορισμού που δίνουν είναι το ίδιο με τις πρώτες 24h. Το ίδιο δείχνει και η μέγιστη προβολή όλων των επιπέδων των κυττάρων στην εικόνα 74.

➤ IDTDPD-Ph/CP2

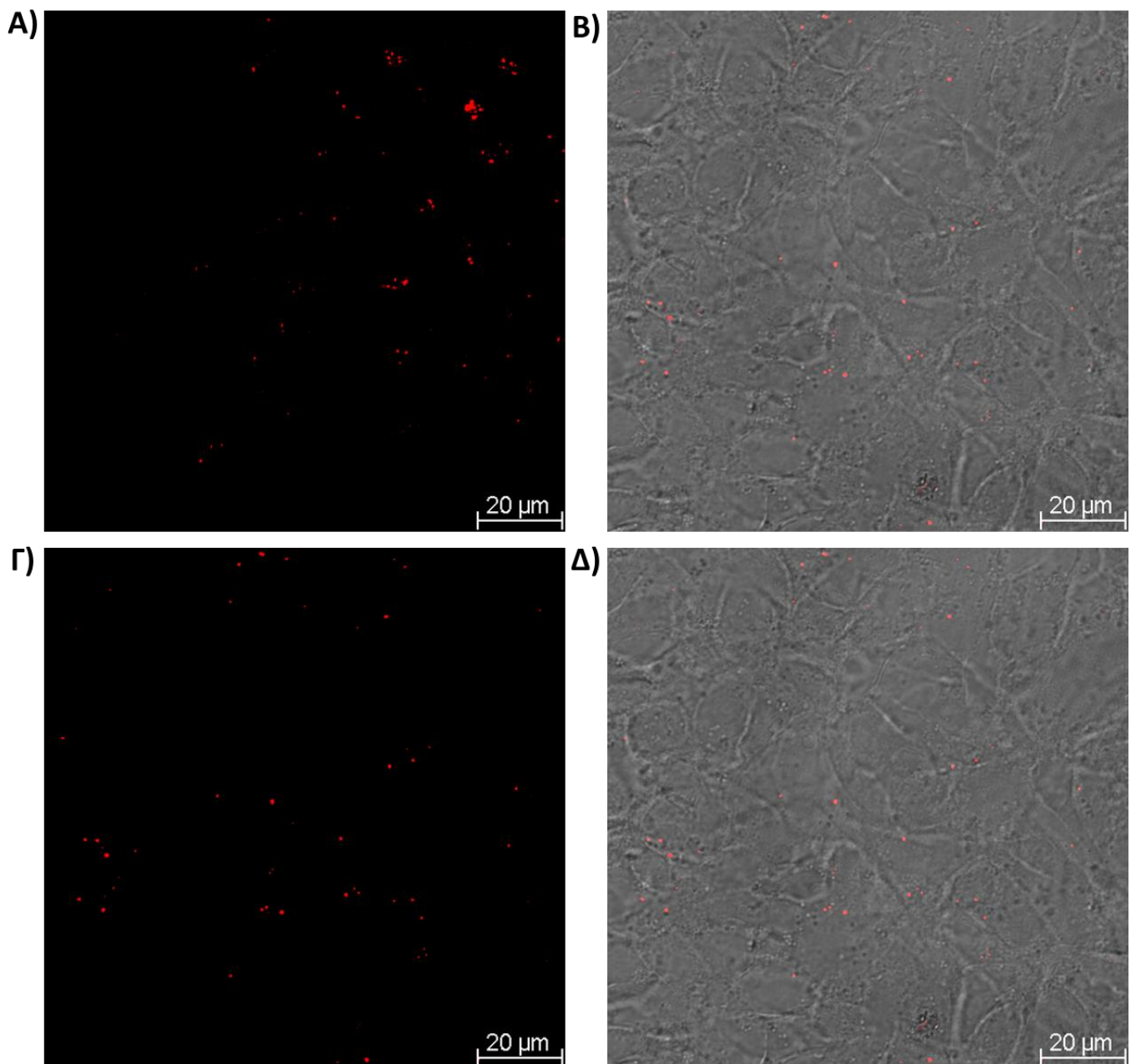


Εικόνα 75: Απεικόνιση (*maximum projection*) HCT-116 κυττάρων με IDTDPD-Ph NPs για **A)**24h και **B)**96h επώασης.



Εικόνα 76: Απεικόνιση HCT-116 κυττάρων με IDTDTPD-Ph NPs για επώαση **A)** 24h κόκκινης φάσης, **B)** 24h συγχώνευσης με φωτεινό πεδίο, **Γ)** 96h κόκκινης φάσης και **Δ)** 96h συγχώνευσης με φωτεινό πεδίο.

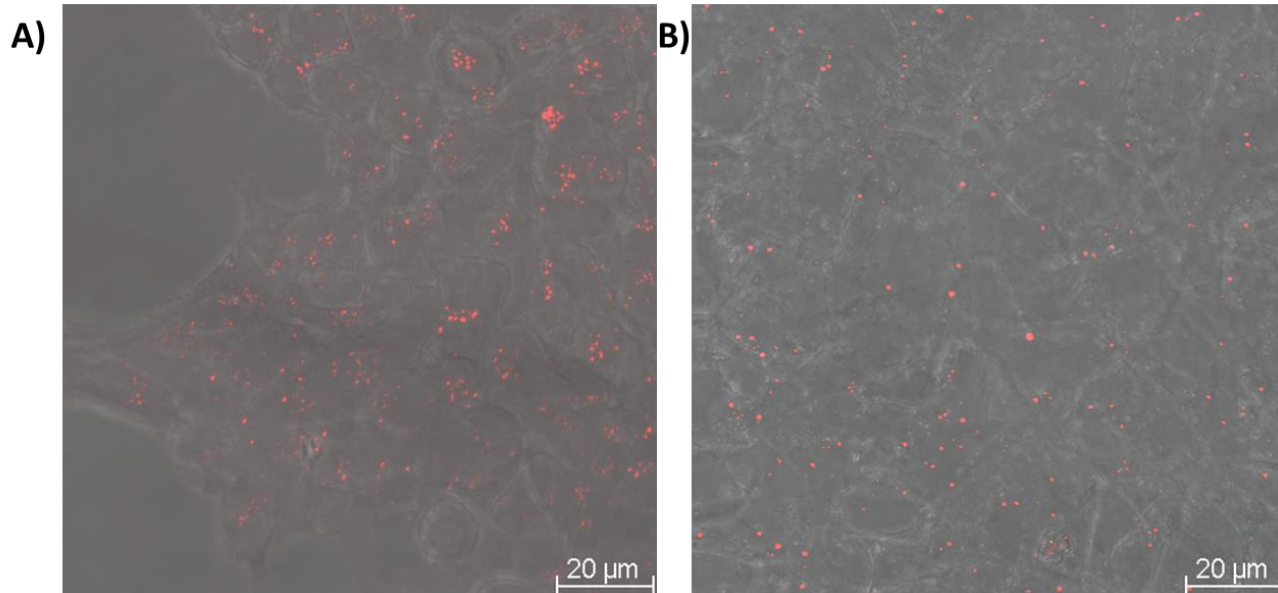
Από τις εικόνες 75 και 76, φαίνεται ότι τα IDTDTPD-Ph NPs και σε αυτή την περίπτωση βρίσκονται εκτός και στην επιφάνεια του κυττάρου σαν συσσωματώματα, αλλά και εντός του κυττάρου. Αυτό παρατηρείται και στις 24h, αλλά και στις 96h. Εξακολουθεί να φαίνεται και σε αυτό το σημείο πως τα κύτταρα αυτά δεν εκκρίνουν τα NPs αλλά συνεχίζουν να μένουν είτε μέσα ή στην επιφάνεια του κυττάρου (μερικά έξω από την κυτταρική μεμβράνη. Δηλαδή ακολουθούν το ίδιο μοτίβο. Για να εξακριβώσουμε αν συμβαίνει κάτι παρόμοιο και στην περίπτωση των IDTDTPD-Th NPs ακολουθούν οι εικόνες 77 και 78.



Εικόνα 77: Απεικόνιση HCT-116 κυττάρων με IDTDPD-Th NPs για επώαση **A)** 24h κόκκινης φάσης, **B)** 24h συγχώνευσης με φωτεινό πεδίο, **Γ)** 96h κόκκινης φάση και **Δ)** 96h συγχώνευσης με φωτεινό πεδίο.

Επιβεβαιώνεται, λοιπόν, ότι και στην περίπτωση των IDTDPD-Th NPs (Εικόνες 77, 78) ότι δεν εκκρίνονται από τα κύτταρα μέχρι και την 4^η μέρα παραμονής τους σε αυτά και το σήμα που δίνουν είναι καλό ακόμα και τότε.

Σε γενικό πλαίσιο, η ιδιότητα αυτή που παρουσιάζουν να μην εκκρίνονται από τα κύτταρα για 4 μέρες, τους προσφέρει πλεονέκτημα ως διαγνωστικά εργαλεία αλλά και ως πιθανούς υποψήφιους νανοφορείς φαρμάκου.



Εικόνα 78: Απεικόνιση (*maximum projection*) HCT-116 κυττάρων με IDTDTTPD-Th NPs για **A)**24h και **B)**96h επώασης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ & ΜΕΛΕΤΗ

7.1.: Υπολογιστική Χημεία της Παρούσας Διπλωματικής Εργασίας

Οι θεωρητικές μελέτες και υπολογισμοί των πολυμερών που μελετώνται στην παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκαν με το πρόγραμμα Gaussian 09W D1(5.0.9). Αναλυτικότερα, έγινε η θεωρητική μελέτη στην θεμελιώδη κατάσταση ώστε να προσδιοριστεί η βέλτιστη γεωμετρία και τα φυσικά χαρακτηριστικά της δομικής μονάδας των CPs, όπου αντί για αλειφατικές αλυσίδες τοποθετήθηκε η -CH₃ ομάδα. Παρ' όλα αυτά η ονομασία της δομικής μονάδας για κάθε πολυμερές θα μείνει η ίδια για να αποφευχθεί η σύγχυση.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε μία προκαταρκτική μελέτη μέσω γρήγορου scanning για την εύρεση των πιθανών δομών με ημι-εμπειρικούς υπολογισμούς, χρησιμοποιώντας την μέθοδο PM6 και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ελαχιστοποίηση των δομών που βρέθηκαν με τη μεθοδολογία DFT. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η B3LYP και η βάση 6-31G+d. Για να αποφανθούμε για τα φάσματα UV-Vis πραγματοποιήθηκαν υπολογισμοί ZINDO και TD-DFT (Time-Dependent- Density Functional Theory). Για τους υπολογισμούς TD χρησιμοποιήθηκαν 2 μέθοδοι, δηλαδή η κλασσική B3LYP και η PBE0 (ή PBE1PBE), μία εναλλακτική μέθοδος με καλύτερη προσέγγιση στην ενέργεια των ηλεκτρονιακών μεταπτώσεων.

Τέλος, έγιναν και υπολογισμοί Φυσικών Τροχιακών Δεσμού ή NBO για να βρεθούν τα φορτία NBO, η τάξη δεσμών και τα αντίστοιχα μοριακά τροχιακά (MO), αλλά και οι αλληλεπιδράσεις με τα δεσμικά-μη δεσμικά τροχιακά και οι αλληλεπιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων τύπου δότη-δέκτη (D-A).

7.2.: Θεωρητική Προσέγγιση του φάσματος UV-Vis των ενώσεων cc150-151-153 με τις μεθόδους ZINDO, TD-B3LYP & TD-PBE0

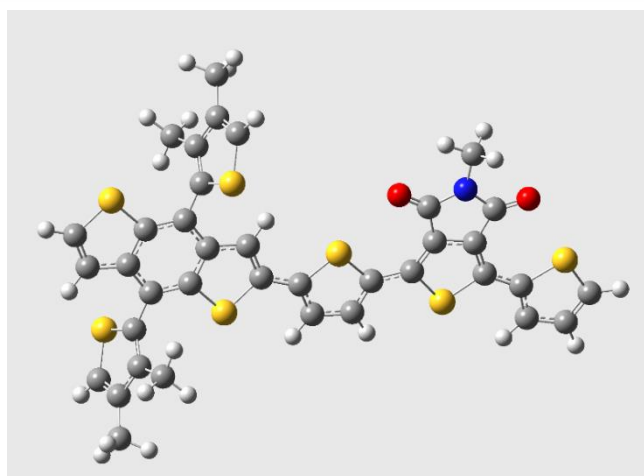
Στην σταθερότερη διαμόρφωση των μελετώμενων ενώσεων έγινε θεωρητικός υπολογισμός τόσο με την μεθοδολογία ZINDO για αέρια κατάσταση, καθώς και σε διαλύτη THF με το μοντέλο IEF-PCM, αλλά και με TD-DFT σε επίπεδο B3LYP/6-31G+d και PBE0/6-31G+d (IEF-PCM=THF). Συνεπώς, παρατίθενται παρακάτω τα θεωρητικά φάσματα UV-Vis σε σύγκριση με το πειραματικό καθώς και ο αντίστοιχος πίνακας που δείχνουν την ισχύ του ταλαντωτή (oscillator strength) f και τις μεταπτώσεις μεταξύ των εμπλεκόμενων μοριακών τροχιακών. Επιπλέον, παρατίθενται και εικόνες με τα μοριακά τροχιακά αυτών των υπολογισμών και κυρίως του HOMO και LUMO, τα οποία όπως θα φανεί είναι η κύρια μετάπτωση που αντιστοιχεί στο μεγαλύτερο $\lambda_{\max}$.

Ο συντελεστής f είναι μία αδιάστατη ποσότητα που εκφράζει την πιθανότητα απορρόφησης ή εκπομπής της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας σε μεταπτώσεις μεταξύ των ενεργειακών επιπέδων ενός ατόμου ή μορίου. Για να συμβεί μια ηλεκτρονική μετάπτωση, πρέπει να διεγείρεται ένα ταλαντευόμενο δίπολο με την αλληλεπίδραση του ηλεκτρικού πεδίου των μορίων με την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Ο συντελεστής f σχετίζεται άμεσα με τον μοριακό συντελεστή απορρόφησης ϵ με την εξής σχέση:

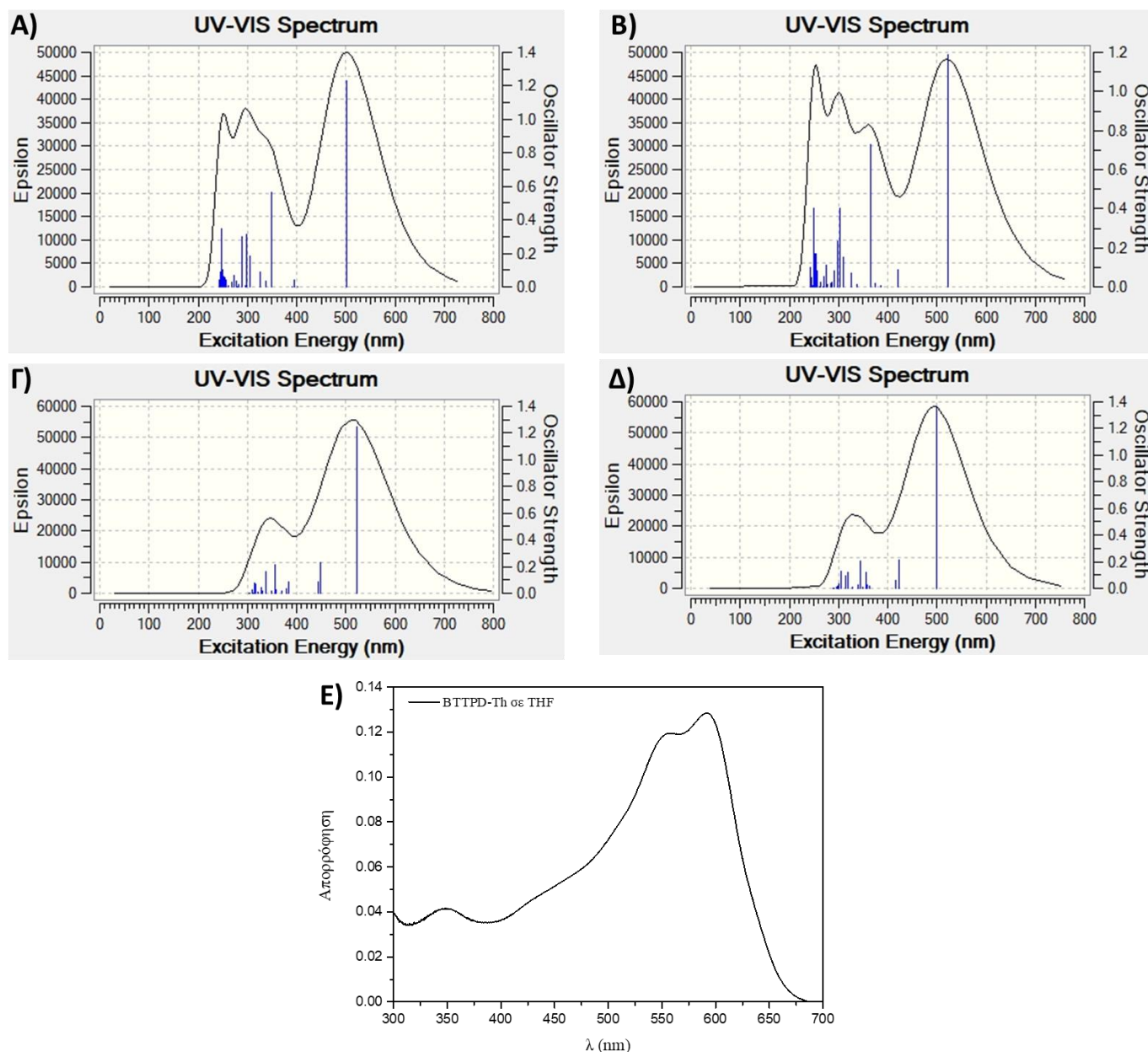
$$f \equiv 3 \cdot 10^{-9} \int \epsilon \, d\nu$$

BTTPD-Th/CP1			
Μέθοδος Υπολογισμού	Theoretical Oscillator Strength (<i>f</i>)	Wavelength λ (nm)	Transition States
ZINDO (αέρια μορφή)	1.3581	538.05	116 (HOMO) → 117 (LUMO) [0.63987]
	0.5032	361.08	116 (HOMO) → 119 (LUMO+2) [0.41796]
	0.3640	317.03	116 (HOMO) → 120 (LUMO+3) [0.27808]
ZINDO (σε THF)	1.2886	567.18	116 (HOMO) → 117 (LUMO) [0.64733]
	0.6902	382.14	116 (HOMO) → 119 (LUMO+2) [0.48005]
	0.3654	322.60	116 (HOMO) → 120 (LUMO+3) [0.32992]
TD-DFT-B3LYP (THF)	1.2490	521.71	191 (HOMO) → 192 (LUMO) [0.70420]
	0.2146	423.10	190 (HOMO - 1) → 192 (LUMO) [0.67541]
	0.2058	343.49	191 (HOMO) → 194 (LUMO+2) [0.61628]
TD-DFT-PBE0 (THF)	1.3670	499.67	191 (HOMO) → 192 (LUMO) [0.69940]
	0.2400	401.02	190 (HOMO-1) → 192 (LUMO) [0.65920]
	0.1684	332.86	191 (HOMO) → 194 (LUMO+2) [0.5100]

Πίνακας 15: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων των θεωρητικών υπολογισμών όσον αφορά την ενέργεια με όλες τις μεθοδολογίες που χρησιμοποιήθηκαν στο Gaussian 09w για τη δομική μονάδα του BTTPD-Th.



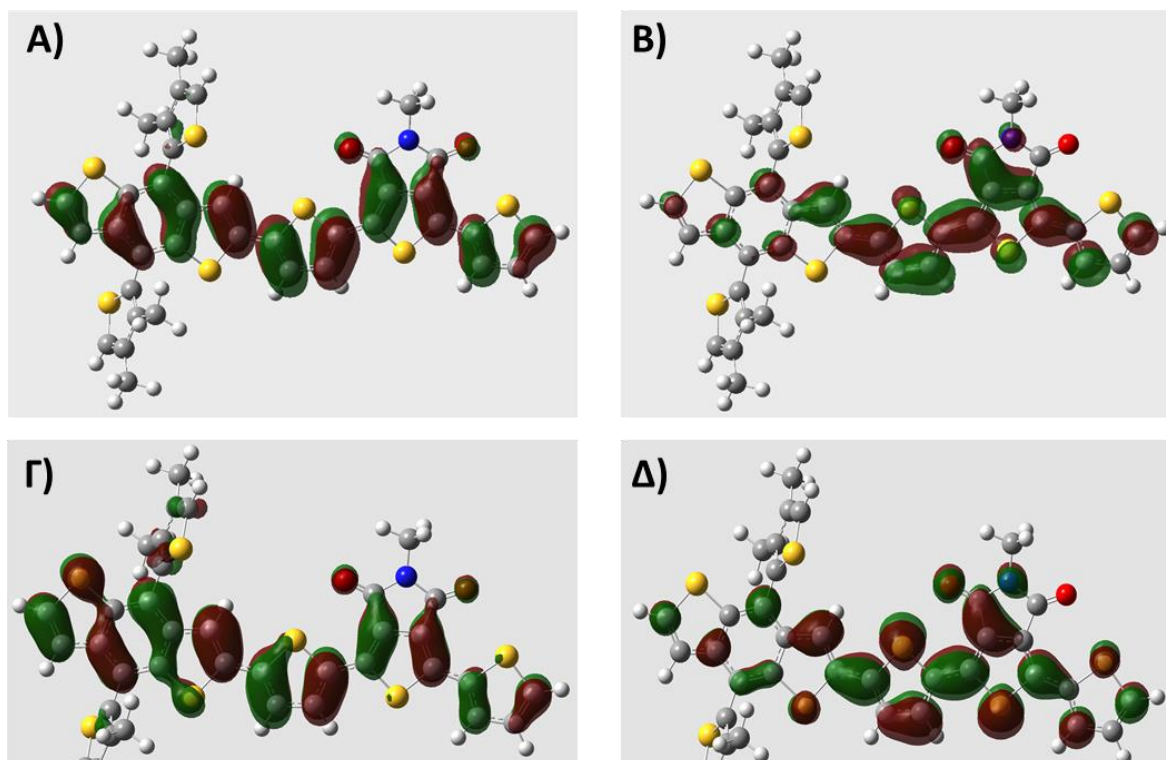
Εικόνα 79: Απεικόνιση της δομικής μονάδας του CP1 μέσω του GaussView 5.0.



Εικόνα 80: Απεικόνιση των θεωρητικών φασμάτων UV-Vis με όλες τις μεθοδολογίες που χρησιμοποιήθηκαν στο Gaussian 09W και του πειραματικού φάσματος για τη δομική μονάδα του BTPD-Th με **A)** ZINDO σε αέρια κατάσταση, **B)** ZINDO σε THF, **Γ)** TD-DFT-B3LYP/6-31+G(d), **Δ)** TD-DFT-PBE0/6-31+G(d) και **E)** πειραματικό φάσμα.

Με βάση τον πίνακα 15 και την εικόνα 77, προκύπτει ότι η μεθοδολογία ZINDO στον διαλύτη THF δίνει το πιο κοντινό αποτέλεσμα $\lambda_{\max}$ και οι 2 διαφορετικές μεθοδολογίες TD-DFT παρουσιάζουν μια διαφορά 20nm. Ωστόσο το θεωρητικό φάσμα UV-Vis των μεθοδολογιών TD-DFT δείχνει καλύτερη προσέγγιση στη συνολική μορφή του πειραματικού φάσματος. Επίσης τα μοριακά τροχιακά HOMO και LUMO φαίνονται να απεικονίζουν καλύτερα τις $\pi \rightarrow \pi^*$ και $n \rightarrow \pi^*$ μεταπτώσεις καλύτερα σε σχέση με την μεθοδολογία ZINDO. Οι ανωτέρω θεωρητικοί υπολογισμοί έδωσαν μια καλή εκτίμηση στην πρόβλεψη της πειραματικής τιμής του μεγίστου $\lambda_{\max}$ η οποία είναι 590nm. Η μικρότερη τιμή που παρατηρήθηκε σε επίπεδο θεωρίας TD-DFT φαίνεται πιο λογικοφανής, αφού σε πειραματικό επίπεδο έχουμε συζυγιακό

πολυμερές και κατ' επέκταση πολλές επαναλαμβανόμενες δομικές μονάδες και όχι μία (όπου έγινε και ο θεωρητικός υπολογισμός).

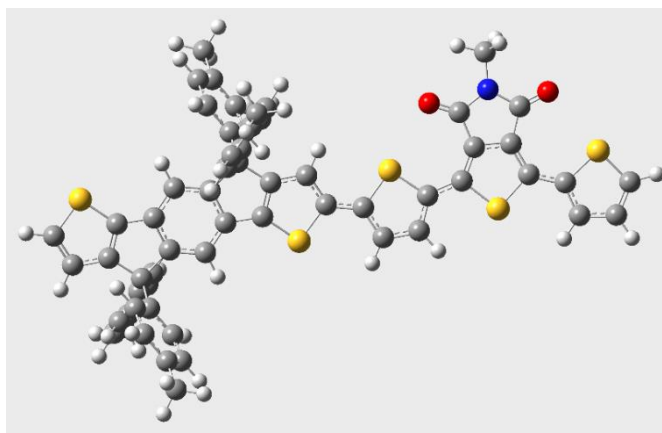


Εικόνα 81: Απεικόνιση των μοριακών τροχιακών που έδωσαν οι μεθοδολογίες που χρησιμοποιήθηκαν στο Gaussian 09W στην περίπτωση του IDTDTPD-Ph, όπου **A)** HOMO από ZINDO (THF), **B)** LUMO από ZINDO (THF), **Γ)** HOMO από TD-PBE0/6-31+G(d), **Δ)** LUMO από TD-PBE0/6-31+G(d).

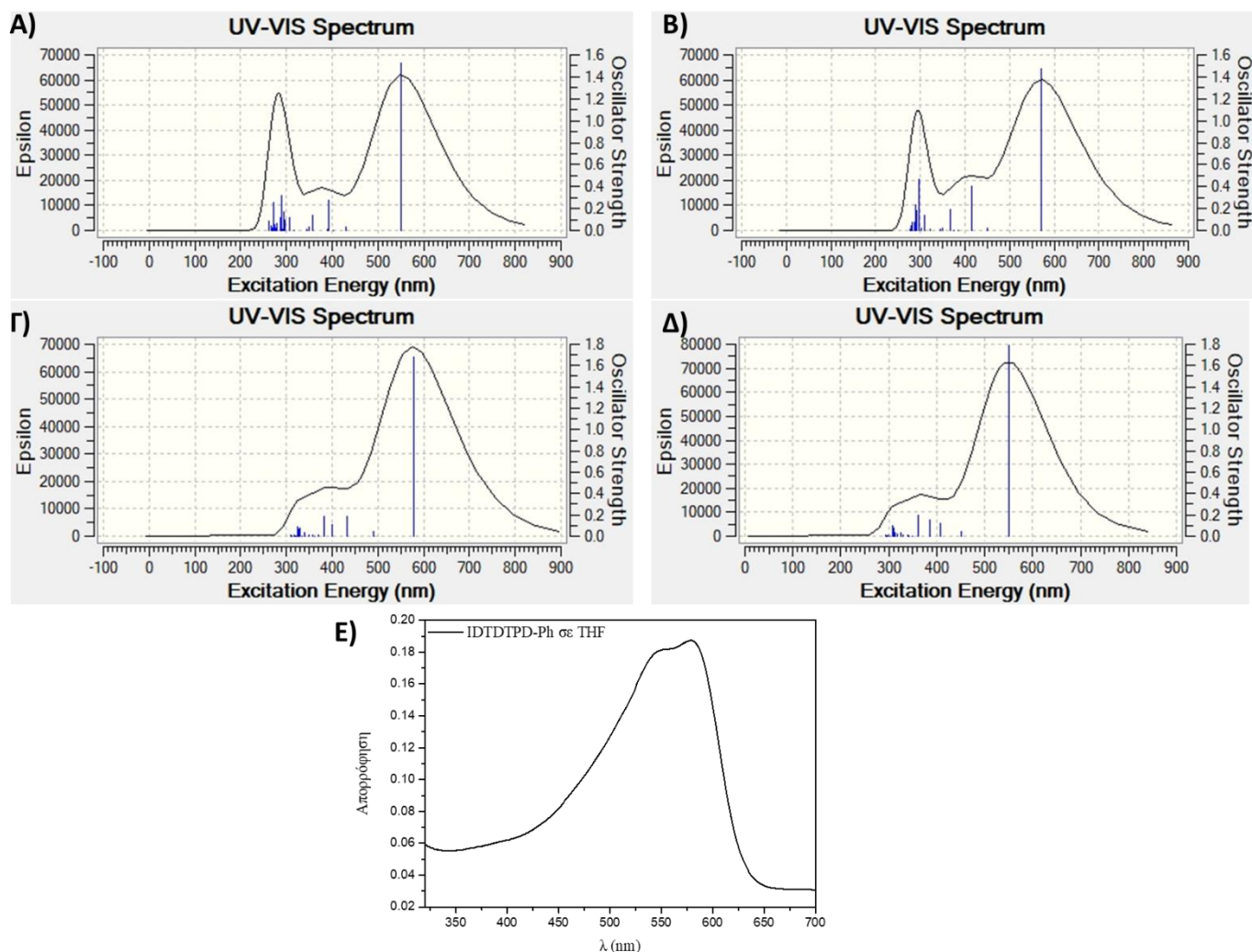
Ακολουθώς, παρατίθενται και τα αντίστοιχα αποτελέσματα για την δομική μονάδα του CP2. Στην περίπτωση αυτή, οι μεθοδολογίες TD-DFT προέβλεψαν καλύτερα την πειραματική τιμή ($\lambda_{\max}=580\text{nm}$) που προέκυψε για το πολυμερές, και η μεταξύ τους διαφορά ήταν 28nm. Επίσης, η μεθοδολογία ZINDO υπολόγισε παραπάνω από την πειραματική τιμή, πράγμα που την καθιστά λιγότερη αξιόπιστη, καθώς και τα αντίστοιχα συνολικά θεωρητικά φάσματα εμφανίζουν πιο έντονες διαφορές απ' ότι αυτά των TD-B3LYP/ 6-31+G(d) και TD-PBE0/6-31+G(d).

IDTDTPD-Ph/CP2			
Μέθοδος Υπολογισμού	Theoretical Oscillator Strength (<i>f</i>)	Wavelength λ (nm)	Transition States
ZINDO (αέρια μορφή)	1.5897	577.72	162 (HOMO) → 163 (LUMO) [0.59216]
	0.2789	393.76	162 (HOMO) → 165 (LUMO+2) [0.40266]
	0.2195	291.39	159 (HOMO-3) → 163 (LUMO) [0.34052]
ZINDO (σε THF)	1.4972	607.62	162 (HOMO) → 163 (LUMO) [0.60355]
	0.3966	422.21	162 (HOMO) → 165 (LUMO+2) [0.42183]
	0.3814	294.04	159 (HOMO-3) → 163 (LUMO) [0.32347]
TD-DFT-B3LYP (THF)	1.6798	578.38	249 (HOMO) → 250 (LUMO) [0.70279]
	0.1891	431.74	248 (HOMO-1) → 250 (LUMO) [0.65794]
	0.1847	382.61	248 (HOMO-1) → 251 (LUMO+1) [0.68552]
TD-DFT-PBE0 (THF)	1.7861	550.74	249 (HOMO) → 250 (LUMO) [0.69779]
	0.1928	360.56	248 (HOMO-1) → 251 (LUMO+1) [0.67113]
	0.1507	384.78	249 (HOMO) → 252 (LUMO+2) [0.67943]

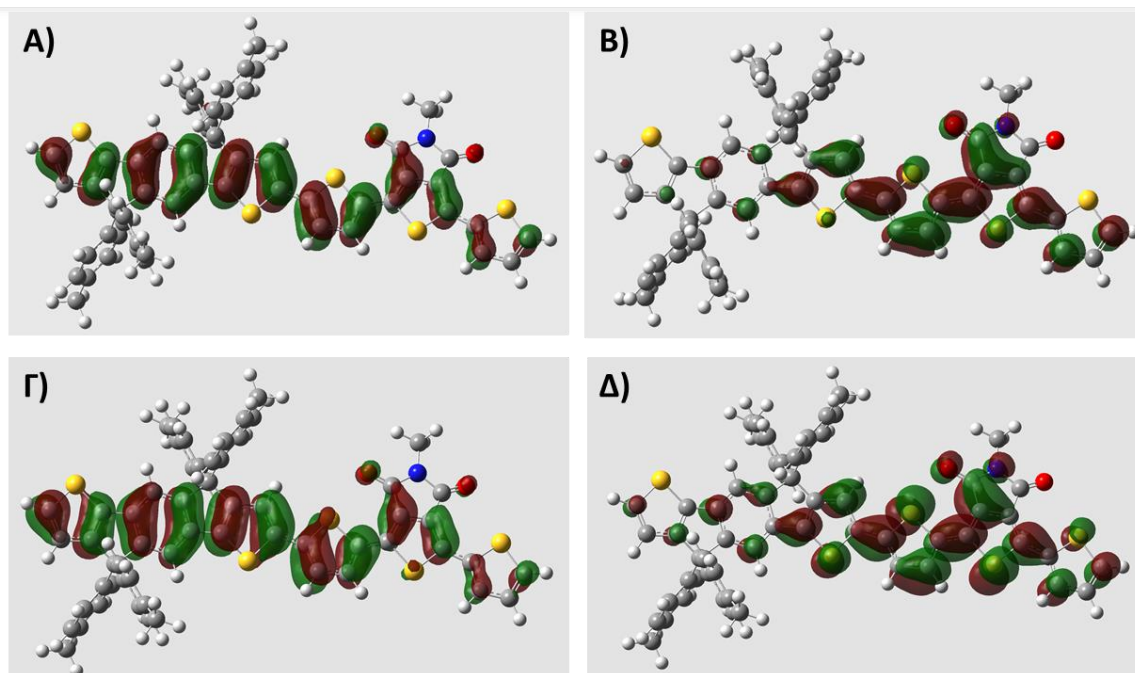
Πίνακας 16: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων των θεωρητικών υπολογισμών όσον αφορά την ενέργεια με όλες τις μεθοδολογίες που χρησιμοποιήθηκαν στο Gaussian 09w για τη δομική μονάδα του IDTDTPD-Ph.



Εικόνα 82: Απεικόνιση της δομικής μονάδας του CP2 μέσω του GaussView 5.0.



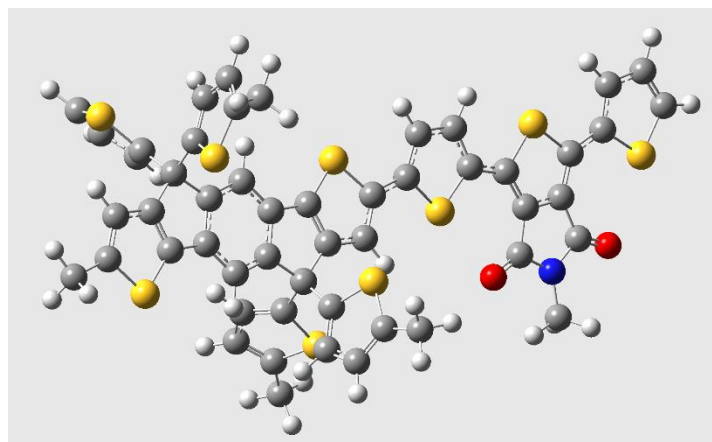
Εικόνα 83: Απεικόνιση των θεωρητικών φασμάτων UV-Vis με όλες τις μεθοδολογίες που χρησιμοποιήθηκαν στο Gaussian 09W και του πειραματικού φάσματος για τη δομική μονάδα του IDTDTDP-Ph με **A)** ZINDO σε αέρια κατάσταση, **B)** ZINDO σε THF, **Γ)** TD-DFT-B3LYP/6-31+G(d), **Δ)** TD-DFT-PBE0/6-31+G(d). και **Ε)** πειραματικό φάσμα.



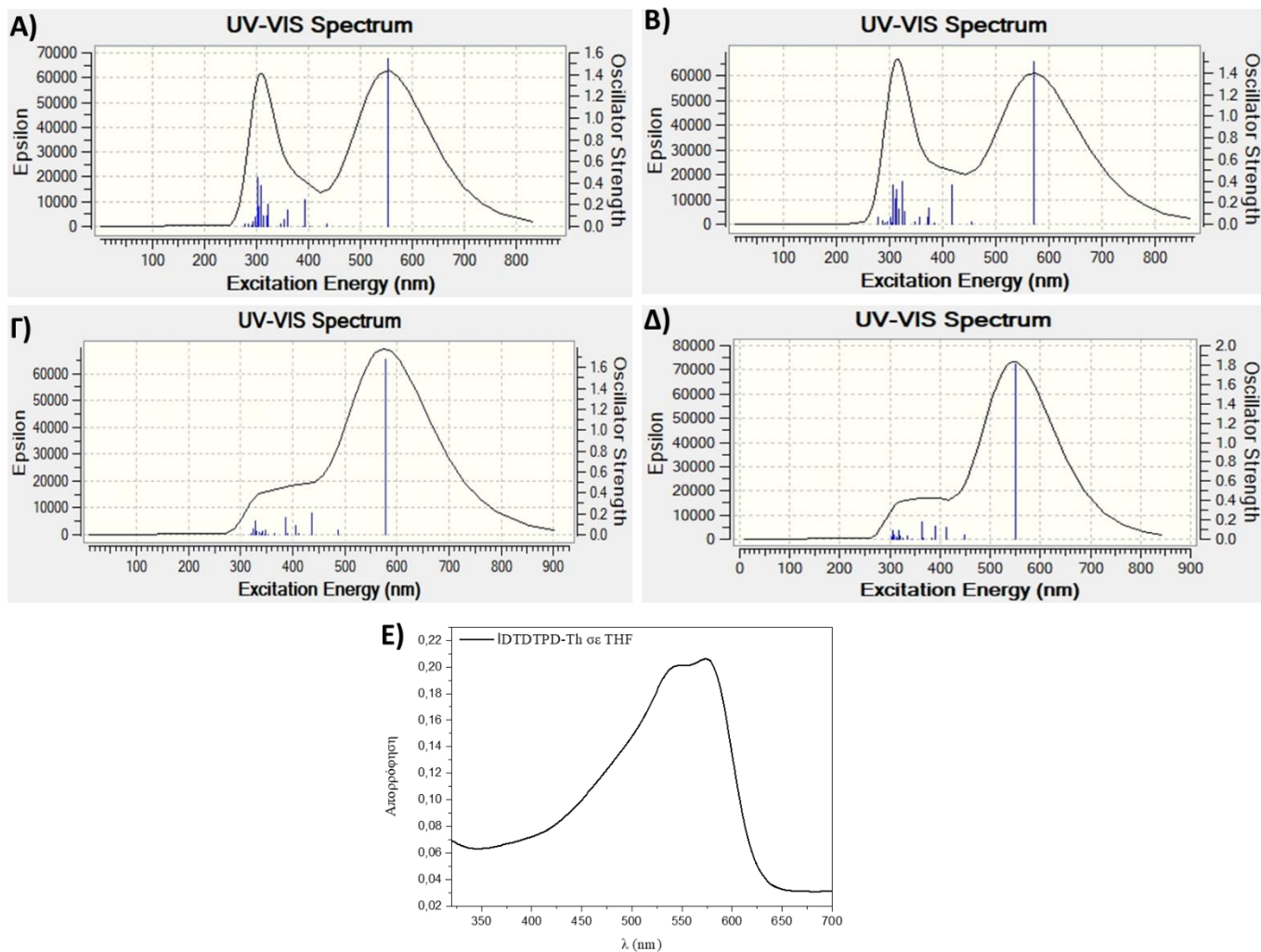
Εικόνα 84: Απεικόνιση των μοριακών τροχιακών που έδωσαν οι μεθοδολογίες που χρησιμοποιήθηκαν στο Gaussian 09W στην περίπτωση του IDTDTDP-Ph, όπου **A)** HOMO από ZINDO (THF), **B)** LUMO από ZINDO (THF), **Γ)** HOMO από TD-PBE0/6-31+G(d), **Δ)** LUMO από TD-PBE0/6-31+G(d).

IDTDTPD-Th/CP3			
Μέθοδος Υπολογισμού	Theoretical Oscillator Strength (<i>f</i>)	Wavelength λ (nm)	Transition States
ZINDO (αέρια μορφή)	1.6082	577.11	154 (HOMO) → 155 (LUMO) [0.58453]
	0.4361	306.08	152 (HOMO-2) → 160 (LUMO+5) [0.23903]
	0.3461	311.64	151 (HOMO-1) → 159 (LUMO+4) [0.26637]
ZINDO (σε THF)	1.5140	606.37	154 (HOMO) → 155 (LUMO) [0.59705]
	0.3921	424.62	154 (HOMO) → 157 (LUMO+2) [0.40666]
	0.3289	324.53	152 (HOMO-2) → 155 (LUMO) [0.36810]
TD-DFT-B3LYP (THF)	1.6853	577.69	253 (HOMO) → 254 (LUMO) [0.70212]
	0.2026	437.55	252 (HOMO-1) → 254 (LUMO) [0.66653]
	0.1652	386.02	252 (HOMO-1) → 255 (LUMO+1) [0.67740]
TD-DFT-PBE0 (THF)	1.8047	549.51	253 (HOMO) → 254 (LUMO) [0.69632]
	0.1803	362.88	252 (HOMO-1) → 255 (LUMO+1) [0.66367]
	0.1393	390.85	253 (HOMO) → 256 (LUMO+2) [0.67951]

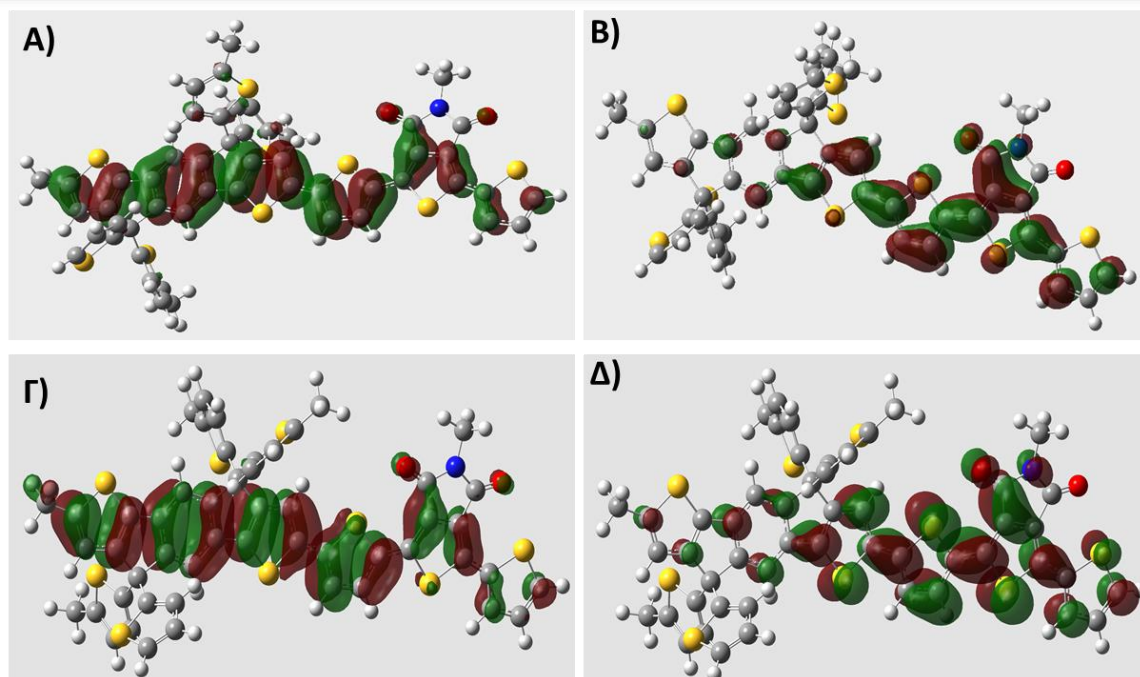
Πίνακας 17: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων των θεωρητικών υπολογισμών όσον αφορά την ενέργεια με όλες τις μεθοδολογίες που χρησιμοποιήθηκαν στο Gaussian 09w για τη δομική μονάδα του IDTDTPD-Ph.



Εικόνα 85: Απεικόνιση της δομικής μονάδας του CP3 μέσω του GaussView 5.0.



Εικόνα 86: Απεικόνιση των θεωρητικών φασμάτων UV-Vis με όλες τις μεθοδολογίες που χρησιμοποιήθηκαν στο Gaussian 09W και του πειραματικού φάσματος για τη δομική μονάδα του IDTDTPD-Th με **A)** ZINDO σε αέρια κατάσταση, **B)** ZINDO σε THF, **Γ)** TD-DFT-B3LYP/6-31+G(d), **Δ)** TD-DFT-PBE0/6-31+G(d) και **E)** πειραματικό φάσμα.



Εικόνα 87: Απεικόνιση των μοριακών τροχιακών που έδωσαν οι μεθοδολογίες που χρησιμοποιήθηκαν στο Gaussian 09W στην περίπτωση του IDTDTPD-Th όπου **A)** HOMO από ZINDO (THF), **B)** LUMO από ZINDO (THF), **Γ)** HOMO από TD-B3LYP/6-31+G(d), **Δ)** LUMO από TD-B3LYP/6-31+G(d).

Τελικώς, στην περίπτωση του CP3 παρατηρούνται ίδιες διαφορές των τιμών $\lambda_{\max}$, καθώς και των θεωρητικών φασμάτων UV-vis και των μοριακών τροχιακών HOMO και LUMO που δίνουν οι μελετώμενες μεθοδολογίες. Συνεπώς, καθίσταται ότι οι μεθοδολογίες TD είναι πιο αξιόπιστες και πιο συγκεκριμένα με B3LYP αφού φαίνεται να δίνει πιο κοντινές τιμές. Παρ' όλα αυτά να μην ξεχνάμε ότι μιλάμε για δομικές μονάδες ενός πολυμερούς, οπότε και η TD-PBE0/6-31+G(d) μπορεί να θεωρηθεί εξίσου αξιόπιστη μέθοδος.

7.3.:Θεωρητική προσέγγιση με Υπολογισμό Φυσικών Τροχιακών Δεσμού (NBO)

Από τον θεωρητικό υπολογισμό NBO μπορούμε να διαπιστώσουμε κάποια στοιχεία για κάποια ένωση υπό μελέτη όσον αφορά την τάξη δεσμού ή την αλληλεπίδραση μεταξύ δότη- δέκτη, όπως αναφέρθηκε και στο κεφάλαιο 7.1.

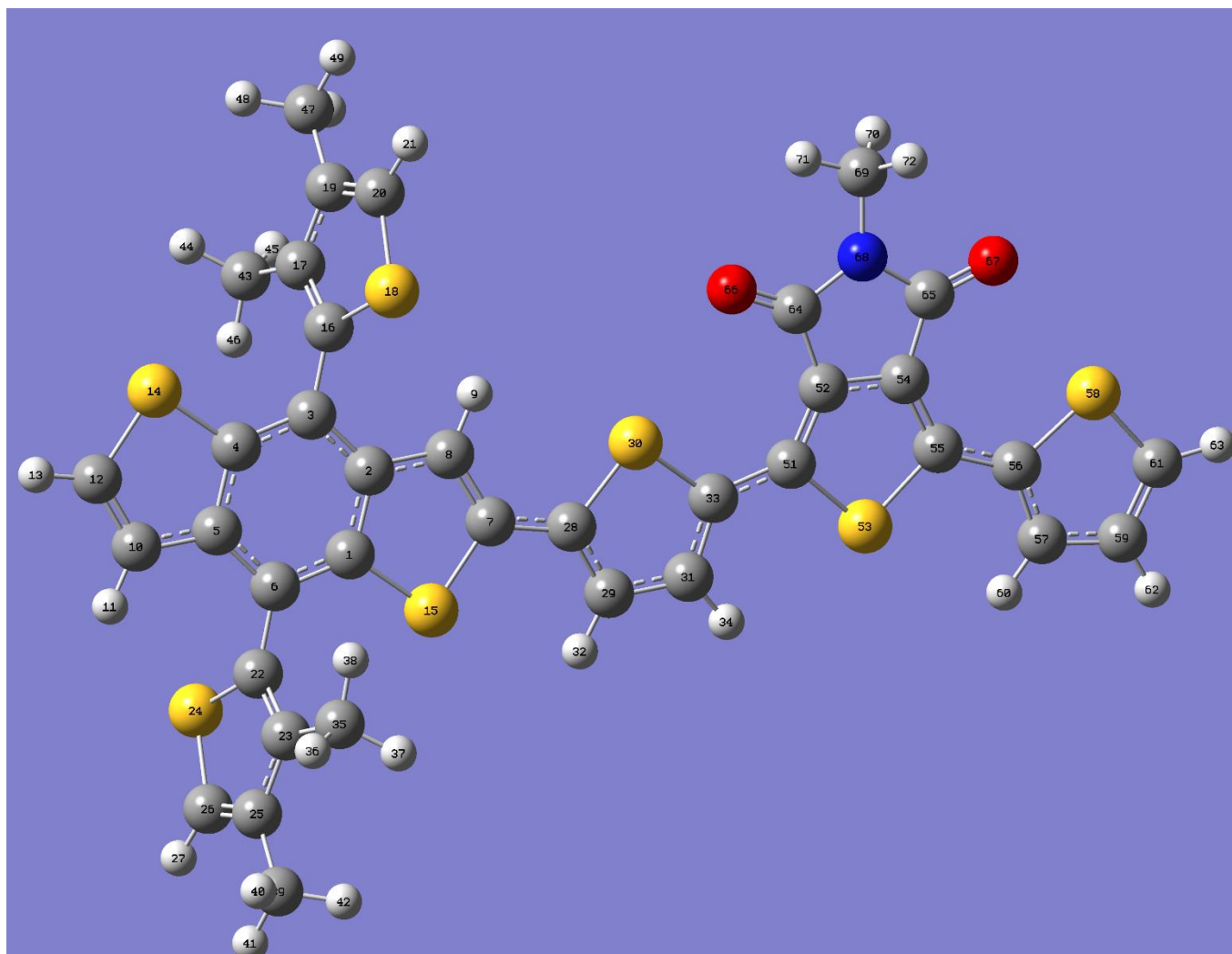
Το αρχείο που προκύπτει από το Gaussian 09W αρχικά μας δίνει κάποιες πληροφορίες όσον αφορά την τάξη δεσμού για κάθε δεσμό στο σύστημα, δηλαδή παρέχει έναν πίνακα δεικτών τάξης δεσμών κατά Wiberg σε βάση των φυσικών ατομικών τροχιακών (Natural Atomic Orbitals, NAO). Με βάση αυτόν τον πίνακα και για κάθε δομική μονάδα πολυμερούς που εξετάστηκε προκύπτουν παρόμοια αποτελέσματα. Αναλυτικότερα, όσον αφορά τη δομική μονάδα του CP1 έδειξε ότι υπάρχει μια ροή π ηλεκτρονίων σε αυτή, και πιο συγκεκριμένα από τη μονάδα του βενζοδιθειοφαινίου προς την διθειενοπυρρολοδιόνη, όπου ακόμα και ο διπλός δεσμός των καρβονυλίων δεν είναι απόλυτα διπλός παρουσιάζοντας τιμές τάξης δεσμού 1.6921 και 1.6948. Έτσι και το άτομο αζώτου που συνδέεται με τους 2 άνθρακες των καρβονυλίων παρουσιάζει τιμές τάξης δεσμού 1.0493 και 1.0530 για κάθε έναν, αλλά και 0.9399 με τον άνθρακα της μέθυλο ομάδας.

Η ίδια ροή π-ηλεκτρονίων, με βάση τον ίδιο πίνακα δεικτών τάξης δεσμών, παρατηρείται και για τις δομικές μονάδες των CP2 και CP3 από τις μονάδα του φαίνυλο- και θιένυλο- υποκατεστημένων ιντακενοδιθειοφαινίων αντίστοιχα προς τη μονάδα της διθειενοπυρρολοδιόνης. Πιο συγκεκριμένα, το CP2 στον δεσμό του ατόμου N με τα καρβονυλικά άτομα C έχει τιμή 1.0473 και 1.0542 για κάθε ένα δεσμό, ενώ ο δεσμός αζώτου με τον C της μέθυλο ομάδας έδωσε τιμή 0.9404. Παρόμοιο φαινόμενο παρατηρείται και μεταξύ των ανθράκων των φαίνυλο- υποκαταστατών και του άνθρακα της μονάδας του ιντακενοδιθειοφαινίου που τα συνδέει στο δομικό αυτό σύστημα. Δηλαδή παρατηρήθηκαν τιμές 0.9-0.96 μεταξύ αυτών και τιμές 1.38-1.41 για τους άνθρακες των φαίνυλο- υποκαταστατών που συνδέονται με το ιντακενοδιθειοφαινίο με τους διπλανούς τους άνθρακες στις φαίνυλο αυτές ομάδες. Τα ίδια ακριβώς ισχύουν και για την περίπτωση του CP3 με τη διαφορά ότι στην περίπτωση των θιένυλο υποκαταστατών οι άνθρακες σύνδεσης με το ιντακενοδιθειοφαινίο με τους αντίστοιχους διπλανούς απ' αυτούς τους άνθρακες (της μονάδας των θειοφαινίων) εμφανίζουν τιμές της τάξης 1.6-1.7 ενώ με το αντίστοιχο άτομο θείου από την άλλη πλευρά εμφανίζουν τιμές 1.2-1.3.

Όλα τα παραπάνω και στο σύνολο ο υπολογισμός αυτός μας δίνει μια πιο ξεκάθαρη εικόνα της ροής των π ηλεκτρονίων με βάση την τάξη δεσμού. Η ροή αυτή ήταν αναμενόμενη μιας και πρόκειται για συζυγιακό σύστημα και υπάρχουν αλληλεπιδράσεις μονάδων δοτών- δεκτών ηλεκτρονίων.

Σε επόμενο στάδιο γίνεται η μια εκτίμηση από την ανάλυση της θεωρίας διαταραχής δεύτερης τάξης της μήτρας Fock με τη βάση φυσικών δεσμικών τροχιακών (Natural Bond Orbitals, NBO, όπου προκύπτουν μερικά τροχιακά δότες ηλεκτρονίων, τροχιακά δέκτες και ενέργεια σταθεροποίησης της αλληλεπίδρασης αυτών. Στους πίνακες παρακάτω παρουσιάζονται η ενέργεια σταθεροποίησης $E(2)$, η διαφορά ενέργειας των τροχιακών $E(j)-E(i)$ και το στοιχείο αλληλεπίδρασης μεταξύ των τροχιακών δότη και δέκτη $F(i, j)$. Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή $E(2)$, τόσο πιο έντονη είναι η αλληλεπίδραση μεταξύ των δοτών - δεκτών ηλεκτρονίων, δηλαδή όσο μεγαλύτερη είναι η ροή των ηλεκτρονίων από δότες ηλεκτρονίων σε δέκτες, τόσο

μεγαλύτερη είναι η επέκταση της συζυγίας ολόκληρου του συστήματος. Ο εντοπισμός της πυκνότητας ηλεκτρονίων μεταξύ των κατειλημμένων τροχιακών NBO τύπου Lewis (δεσμός ή μη δεσμικό ζεύγος) και τυπικά μη κατειλημμένα (αντι-δεσμικά ή Rydberg) μη-Lewis NBO αντιστοιχούν σε μια σταθεροποιητική αλληλεπίδραση δότη-δέκτη. Συμβολίζονται με BD τα δεσμικά τροχιακά και με BD* τα αντιδεσμικά μεταξύ των ατόμων που απεικονίζονται. Ξεκινώντας με το CP1, παρατίθενται πρώτα μια εικόνα του με τα αντίστοιχα νούμερα κάθε ατόμου και ο πίνακας με κάποια ενδεικτικά από τα NBOs.

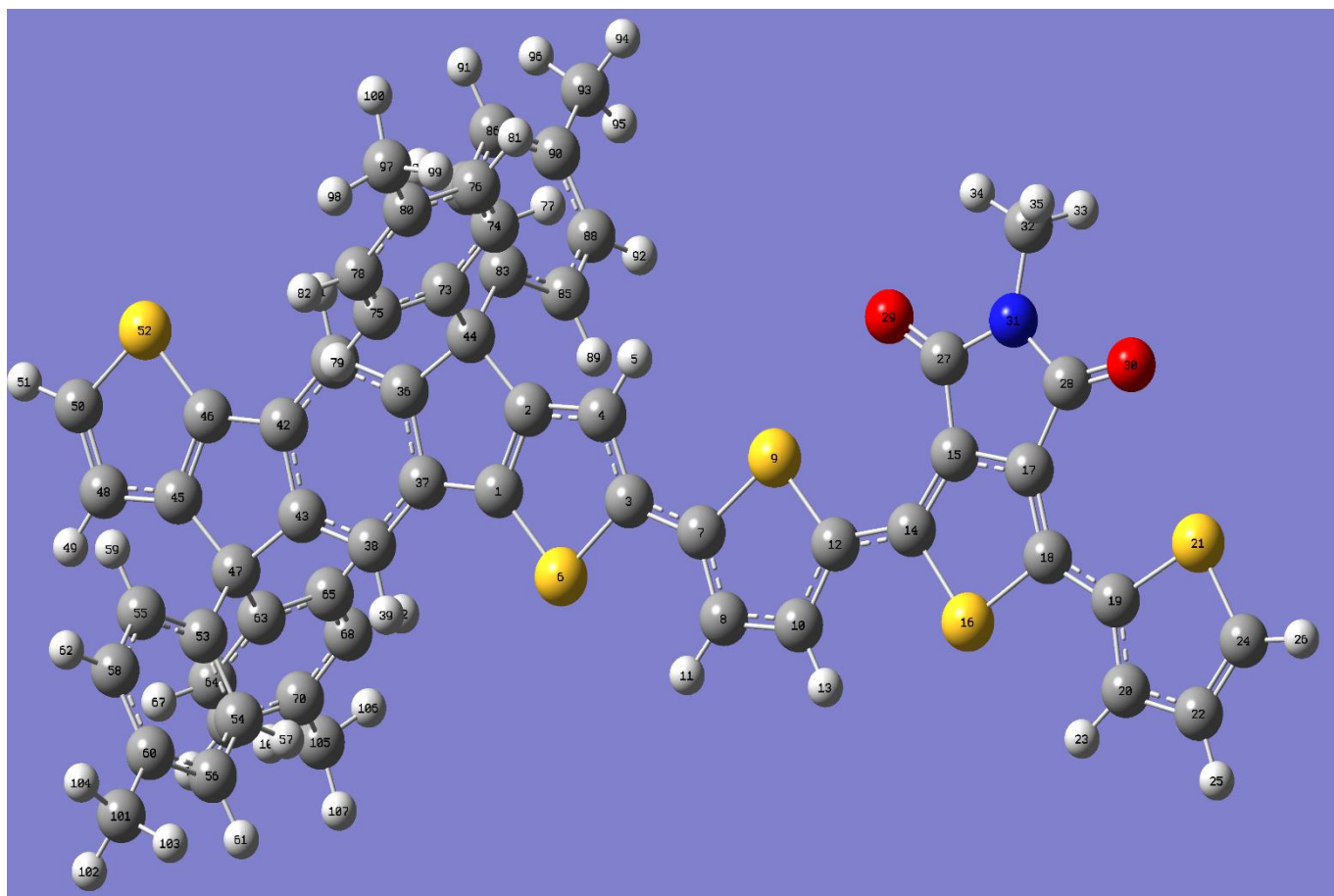


Εικόνα 88: Απεικόνιση της δομικής μονάδας του BTTPD-Th/CP1 με νούμερα σε κάθε άτομο.

Παρατηρείται ότι υπάρχει μεγαλύτερη $E(2)$ (>10 kcal/mol) με βάση τον πίνακα 18, το οποίο σημαίνει ότι στις παραπάνω μεταπτώσεις υπάρχει και πιο έντονος απεντοπισμός των ηλεκτρονίων από τον αντίστοιχο δεσμό σε κάποιον άλλον. Για παράδειγμα, φαίνεται ότι το BD των [C10-C12] (βρίσκεται στο βενζοδιθειοφαινίου) πάει στο αντίστοιχο αντιδεσμικό των [C2-C8] και έτσι ο ένας δεσμός του ενός εκ των δύο θειοφαινίων του βενζοδιθειοφαινίου απεντοπίζει τα ηλεκτρόνια του προς το *[C2-C8] που βρίσκεται στην άλλη μονάδα θειοφαινίου του βενζοδιθειοφαινίου. Σε συνολική εικόνα φαίνεται ότι υπάρχει απεντοπισμός ηλεκτρονίων σε όλο το σύστημα από τον κύριο σκελετό μέχρι και τις μεθυλομάδες των θιένυλο- υποκαταστατών του βενζοδιθειοφαινίου.

BTTPD-Th/CP1				
Δότης NBO (i)	Δέκτης NBO (j)	E(2) σε kcal/mol	E(j)-E(i) σε a.u.	F(i,j) σε a.u.
BD C10 - C12	BD* C2 - C8	48.84	0.75	0.175
BD C10 - C12	BD* C4 - C5	319.0	0.29	0.278
BD C10 - C12	BD* C10 - C12	752.84	0.01	0.084
BD C10 - C12	BD* C22 - S24	79.78	0.17	0.107
BD C28 - C29	BD* C31 - C33	18.32	0.28	0.066
BD C52 - C54	BD* C59 - H62	75.90	0.57	0.187
BD C52 - C54	BD* C4 - C5	61.61	0.52	0.160
BD C54 - C65	BD* C43 - H45	718.60	0.03	0.127
BD C54 - C65	BD* C4 - C5	350.01	0.77	0.463
BD C65 - O66	BD* C57 - H60	1002.90	0.18	0.381
BD C65 - N68	BD* C26 - H27	401.65	0.08	0.158
BD C69 - H70	BD* C23 - C25	2419.05	0.05	0.297

Πίνακας 18: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων των θεωρητικών υπολογισμών NBO για το BTTPD-Th/CP1.



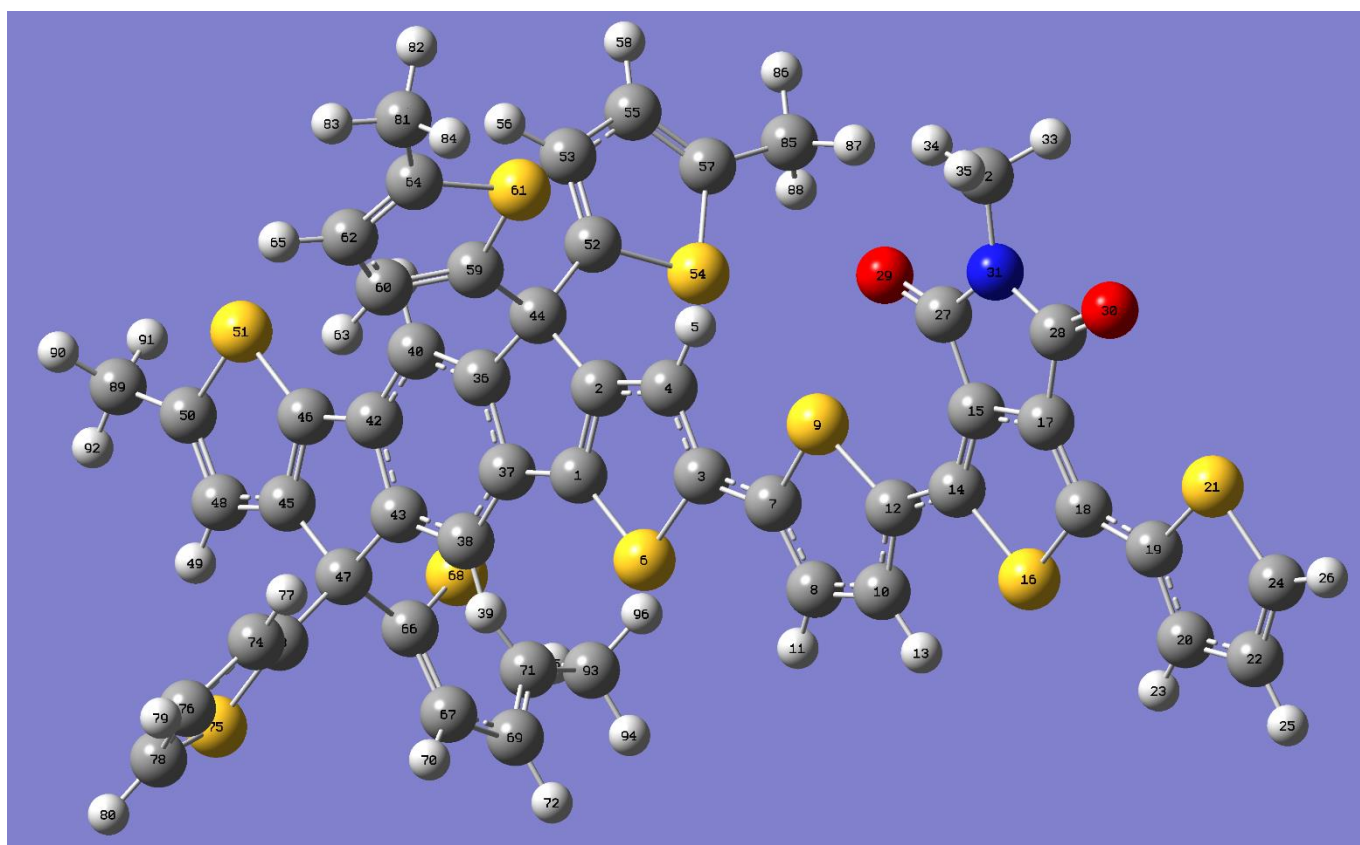
Εικόνα 89: Απεικόνιση της δομικής μονάδας του IDTDPD-Ph/CP2 με νούμερα σε κάθε άτομο.

Βλέποντας και τον πίνακα 19 για την περίπτωση του CP2 παρατηρούμε μεγάλες ενέργειες σταθεροποίησης και απεντοπισμό ηλεκτρονίων από [C7-C8] προς *[C10-C12], αλλά και από [C10-C12] προς *[C14-C15], κτλ δηλαδή στην μονάδα της διθειενοπυρρολοδιόνης. Παρ' όλα αυτά έχουμε και από την μονάδα του IDT προς

την διθειενοπυρρολοδιόνη, αλλά και μεταξύ των φαίνυλο- υποκαταστατών, όπως παραδείγματος χάριν [C105-H108] προς *[C85-H89].

IDTDTDP-Ph/CP2				
Δότης NBO (i)	Δέκτης NBO (j)	E(2) σε kcal/mol	E(j)-E(i) σε a.u.	F(i,j) σε a.u.
BD C7 – C8	BD* C10 – C12	18.89	0.28	0.067
BD C10 - C12	BD* C14 – C15	19.25	0.28	0.068
BD C17 - C18	BD* C28– O30	18.18	0.29	0.066
BD C19 - C20	BD* C17 – C18	18.06	0.28	0.067
BD C22 – C24	BD* C19 – C20	16.62	0.28	0.065
BD C31- C32	BD* C93– H94	20.90	0.13	0.047
BD C36 – C37	BD* C38 – C43	18.18	0.28	0.065
BD C36 – C37	BD* C40 – C42	19.46	0.28	0.066
BD C36 – C37	BD* C1 – C2	16.20	0.27	0.059
BD C105-H108	BD* C85– H89	894.54	0.09	0.254

Πίνακας 19: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων των θεωρητικών υπολογισμών NBO για το IDTDTDP-Ph/CP2.



Εικόνα 90: Απεικόνιση της δομικής μονάδας του IDTDTDP-Th/CP3 με νούμερα σε κάθε άτομο.

Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρούνται και στην περίπτωση του CP3 με βάση τον πίνακα 20, αφού παρατηρούνται μεταβάσεις μέσα στην δομική μονάδα του IDT, αλλά και προς την μονάδα της διθειενοπυρρολοδιόνης, όπως [C3-C4] προς *[C7-C8] και στη συνέχεια [C7-C8] προς *[C10-C12]. Παράλληλα υπάρχει και απεντοπισμός (ροή)

ηλεκτρονίων προς τους θιένυλο υποκαταστάτες από την διθειενοπυρρολοδιόνη και πιο συγκεκριμένα στην μετάβαση από τα [C27-O29] προς τα *[C76-H79].

IDTDTPD-Th/CP3				
Δότης NBO (i)	Δέκτης NBO (j)	E(2) σε kcal/mol	E(j)-E(i) σε a.u.	F(i,j) σε a.u.
BD C1 - C2	BD* C3 - C4	17.31	0.28	0.064
BD C1 - C2	BD* C36 - C37	13.26	0.30	0.059
BD C3 - C4	BD* C7 - C8	16.45	0.28	0.063
BD C7 - C8	BD* C10 - C12	29.59	0.14	0.060
BD C10 - C12	BD* C14 - C15	19.36	0.28	0.068
BD C12 - C14	BD* C7 - C8	63.23	1.43	0.268
BD C12 - C14	BD* C20 - C22	55.57	1.42	0.252
BD C12 - C14	BD* C40- H41	87.67	1.28	0.300
BD C17 - C18	BD* C28- O30	18.16	0.29	0.066
BD C24 - H26	BD* C53 -H56	6039.75	8.54	6.414
BD C27 - O29	BD* C76 -H79	292.31	0.49	0.338
BD N31 - C32	BD* C7- C8	244.16	15.69	1.752
BD N31 - C32	BD* C73- S75	37.75	15.54	0.687
BD C52 - S54	BD* C20 -C22	84.27	1.52	0.321
BD C55 - C57	BD* C7 -C8	231.96	8.14	1.227

Κεφάλαιο 8: Σύνοψη Αποτελεσμάτων και Συμπεράσματα

Με βάση το κεφάλαιο 6 και 7, και βλέποντας όλα τα πειραματικά και θεωρητικά αποτελέσματα, είναι ασφαλές να συμπεράνουμε ότι τα συντιθέμενα και εξεταζόμενα συζυγιακά πολυμερή της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελούν τρία πολυμερή με υποσχόμενες οπτικές ιδιότητες τις οποίες μεταβιβάζουν και στα αντίστοιχα νανοσωματίδια τους με όποια μέθοδο παρασκευαστούν.

Αρχικά, τα τρία CPs συντέθηκαν και χαρακτηρίστηκαν επιτυχώς. Επίσης, κατάφεραν να κατασκευαστούν NPs των πολυμερών αυτών με δύο μεθόδους, την νανοκαταβύθιση και τον εγκλωβισμό σε υδατικό μέσο (νερό). Αυτό αποτελεί ένα σπουδαίο φαινόμενο αφού υδροφοβικά μόρια και πολυμερή, όπως τα τρία εξεταζόμενα CPs, καταφέρνουμε να τα διαλύουμε σε πολικούς διαλύτες, όπως το νερό, με αποτέλεσμα να μπορούν να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω και σε βιολογικές εφαρμογές. Όσον αφορά, τις οπτικές τους ιδιότητες, τα πολυμερή αυτά (διαλυμένα σε THF) απορροφούν στην ορατή περιοχή (570-590nm) και εκπέμπουν στην ορατή περιοχή (683-697nm) αλλά και στην περίπτωση του BTTPD-Th (683, 728nm) στην αρχή της υπέρυθρης περιοχής (NIR-I), το οποίο είχε όπως φαίνεται δύο κορυφές σε αντίθεση με τα IDTDTPD-Ph και IDTDTPD-Th. Επιπλέον, βρέθηκε να έχουν κβαντικές αποδόσεις από 31% έως 43% περίπου. Οι θεωρητικές μελέτες που έγιναν έδωσαν καλή απάντηση ως προς την απορρόφηση των πολυμερών και πιο συγκεκριμένα με τις μεθοδολογίες TD-B3LYP/6-31+G(d) και TD-PBE0/6-31+G(d). Ο υπολογισμός NBO έδωσε, επίσης, μια καλή ανάλυση της μεταφοράς των ηλεκτρονίων, το οποίο αναμενόταν μιας και μιλάμε για π-συζυγιακό σύστημα.

Στην περίπτωση των νανοσωματιδίων, αυτά κατασκευάστηκαν και χαρακτηρίστηκαν επιτυχώς με την μέθοδο της νανοκαταβύθισης, καθώς και του εγκλωβισμού με τη βοήθεια του αμφίφιλου mPEG-b-PLGA. Στην περίπτωση και των δύο μεθόδων, το μέγεθος των νανοσωματιδίων κυμαίνεται από 80-140nm για όλα τα πολυμερή και πράγμα που τα καθιστά ιδανικά για μελέτες σε καρκινικά κύτταρα. Επίσης, οι οπτικές ιδιότητες των πολυμερών, όπως αναφέρθηκε ήδη, μεταφέρονται και στα νανοσωματίδια τους (διαλυμένα σε νερό) με διαφορά την υψοχρωμική μετατόπιση των βασικών κορυφών τους και βαθυχρωμική μετατόπιση των ώμων στο φάσμα απορρόφησης, τα οποία όμως συνεχίζουν να απορροφούν στην ορατή περιοχή (540-610nm) και να εκπέμπουν στην ίδια περιοχή για την περίπτωση των IDTDTPD-Ph και IDTDTPD-Th, ενώ η εκπομπή εμφανίζεται πλέον μόνο στην αρχή της NIR-I περιοχής για το BTTPD-Th, στο οποίο είχαμε μόνο ένα μέγιστο μήκος κύματος απορρόφησης αντί για δύο όπως προηγουμένως. Συνολικά, η συμπεριφορά μεταξύ των πολυμερών στο THF και των νανοσωματιδίων όσον αφορά την απορρόφηση και εκπομπή είναι παρόμοια. Επίσης, η προσθήκη του αμφίφιλου, όσον αφορά τα φάσματα απορρόφησης και εκπομπής συναρτήσει του μήκους κύματος, δεν επηρέασε ιδιαίτερα τις οπτικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων μιας και η διαφορά στα μέγιστα είναι της τάξης των 5nm. Επιπρόσθετα, οι κβαντικές τους αποδόσεις κυμαίνονται από 3,5 έως 9,2% στην περίπτωση των νανοκαταβυθιζόμενων νανοσωματιδίων, ενώ για τα εγκλωβισμένα νανοσωματίδια από 2.9 έως 7% περίπου.

Εκμεταλλευόμενοι τις ιδιότητες αυτές των νανοσωματιδίων των συζυγιακών πολυμερών, τα οποία παρουσιάζουν καλύτερη κβαντική απόδοση από χρωστικές

όπως η πράσινη ινδοκυανίνη (Indocyanine green, ICG), η οποία έχει 2,5% στο νερό,⁶⁷ χρησιμοποιήθηκαν σε μελέτες *in vitro* σε καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου HCT-116 και σε κάποια υγιή ενδοθηλιακά κύτταρα HUVECs για να εξεταστούν ως ιχνηθέτες φθορισμού μόνο τα νανοσωματίδια μέσω νανοκαταβύθισης. Συνεπώς, με βάση τα αποτελέσματα αντίστοιχων *in vitro* πειραμάτων, και τα τρία CPNs έδωσαν καλή κυτταρική ανάπτυξη όταν συνδυάζονταν με τις κυτταρικές σειρές που προαναφέρθηκαν σε συγκεντρώσεις 0,5μg/ml και κάτω. Δηλαδή φάνηκαν να μην είναι τοξικά για τα κύτταρα αυτά. Στη συνέχεια, και τα τρία αυτά είδη CPNs φάνηκαν να φθορίζουν σε λέιζερ διέγερσης 561nm στο συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με λέιζερ και στις δύο κυτταρικές σειρές εντός των κυττάρων αυτών, το οποίο επιβεβαίωσε την εισαγωγή τους μέσα στα κύτταρα ύστερα από 24h. Περαιτέρω μελέτες των υπό μελέτη CPNs στην παρούσα εργασία στα καρκινικά κύτταρα HCT-116 έδειξαν ότι ύστερα από επώαση 24h εισέρχονται στα λυσοσώματα και στα πολυκυστιδιακά σωμάτια, αφού έδειξαν συντεντοπισμό με τα αντισώματα LAMP1 και CD63 που ανιχνεύουν τα τμήματα αυτά αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, δεν φάνηκαν να καταστρέφουν τα λυσοσώματα των HCT-116 κυττάρων ύστερα από 24h, γεγονός που επιβεβαίωσε πείραμα σε ζωντανή απεικόνιση αυτών στο συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού με τη βοήθεια χρωστικής Lucifer Yellow. Επιπρόσθετα, ο χρόνος εκκίνησης εισαγωγής των CPNs στα HCT-116 φάνηκε να είναι οι 6h. Τέλος, τα κύτταρα HCT-116 σε συνδυασμό με τα CPNs σε επώαση τους για αρχικά 24h και παρακολούθησής τους μετά από 96h, έδειξαν ότι τα νανοσωματίδια δεν εκκρίνονται από τα αυτά και παραμένουν μέσα σε αυτά φθορίζοντας ακόμα. Πρέπει να σημειωθεί ότι είχαν εισαχθεί τις πρώτες 24h και μετά από αυτό το χρονικό διάστημα χωρίς τα CPNs τα κύτταρα συνεχίζουν να αυξάνονται και να αναπτύσσονται κανονικά.

Παρότι παρατηρήθηκαν τα παραπάνω *in vitro* αποτελέσματα, υπάρχουν κάποιες διαφοροποιήσεις μεταξύ των διαφορετικών νανοσωματιδίων των πολυμερών. Δηλαδή τα BTPD-Th NPs έδειξαν καλό ποσοστό εισαγωγής στα HCT-116 και HUVECs, αλλά είχαν τη χαμηλότερη ένταση φθορισμού από τα τρία μέσα στα κύτταρα. Όσον αφορά τα IDTDPD-Ph NPs, φάνηκαν να έχουν ισχυρή ένταση φθορισμού με τη διαφορά ότι στην περίπτωση αυτών, μόνο ένα μικρό ποσοστό νανοσωματιδίων εισέρχονταν στα κύτταρα και το υπόλοιπο φαινόταν να «κολλάει» πάνω στα κύτταρα ή γύρω απ' αυτά. Το ποσοστό των IDTDPD-Ph NPs, που κατάφεραν να εισαχθούν, παρουσίαζε τα *in vitro* αποτελέσματα που περιεγράφηκαν παραπάνω και για τα τρία πολυμερή. Έμφαση πρέπει να δοθεί, λοιπόν, στα IDTDPD-Th NPs, τα οποία εκτός από εξαιρετική ένταση φθορισμού στα κύτταρα, είχαν και εξαιρετικό ποσοστό εισαγωγής σε κάθε υπό μελέτη δείγμα σε όλα τα κύτταρα που υπήρχαν στις καλυπτρίδες. Κατά συνέπεια, αυτό είναι το είδος του πολυμερούς σε μορφή νανοσωματιδίων, στο οποίο θα πρέπει να επικεντρωθεί η περαιτέρω μελέτη ως ιχνηθέτης φθορισμού λόγω του εξαιρετικού σήματος που δίνει αλλά και της αυξημένης δυνατότητας του να εισέρθει στα καρκινικά κύτταρα.

Διανύοντας από τις πιο δύσκολες εποχές όσον αφορά την υγεία και τις ασθένειες που προσβάλλουν το ανθρώπινο είδος, κρίνεται εξαιρετικής σημασίας η επιστήμη και η έρευνα να συνεχίσει να μελετά και να βελτιώνει ήδη υπάρχουσες θεραπείες ή να αναπτύσσει καινοτόμες ιδέες στον τομέα της διάγνωσης και της θεραπείας. Ως γνωστόν, η έγκαιρη διάγνωση είναι και η καλύτερη λύση για οποιαδήποτε ασθένεια. Ασθένειες, όπως ο καρκίνος, έχουν απασχολήσει και συνεχίζουν να απασχολούν όλη την επιστημονική κοινότητα μιας και είναι η 2^η αιτία θανάτου παγκοσμίως και αποτελεί μία ποικιλόμορφη, επιθετική ασθένεια που μπορεί να προσβάλλει από νεογνά έως και ηλικιωμένους ανθρώπους. Μέχρι στιγμής, οι πιο συχνές μορφές είναι όταν εμφανίζεται στο στήθος μια γυναίκας ή στον προστάτη ενός άντρα, στον ένα ή στους δύο πνεύμονες ενός ανθρώπου και στο παχύ έντερο. Όσον αφορά τον καρκίνο, η ανάπτυξη της τεχνολογίας και πιο συγκεκριμένα της Νανοτεχνολογίας και της Νανοϊατρικής βασίζονται στο φαινόμενο Ενισχυμένης Διαπερατότητας και Κατακράτησης (EPR) των καρκινικών κυττάρων. Δηλαδή δίνει ένα πολύ σημαντικό πλεονέκτημα έναντι των ήδη υπάρχοντων μεθόδων, αφού σωματίδια μεγέθους νανοκλίμακας μπορούν να διαπεράσουν μέσα από σχηματιζόμενες οπές των καρκινικών ιστών, οι οποίες δεν εμφανίζονται στον υγιή ιστό.

Για το λόγο αυτό, γίνεται αναζήτηση ενώσεων και υλικών που μπορούν να μετατραπούν σε νανοσωματίδια και να έχουν εξαιρετικές οπτικές ιδιότητες για εφαρμογή σε Βιοαπεικόνιση και Θεραπεία, αλλά και να είναι βιοσυμβατά. Τέτοια είναι φωτονικά υλικά και πιο ειδικά συζυγιακά πολυμερή τα οποία παρουσιάζουν εξαιρετικές οπτικοηλεκτρονικές ιδιότητες. Η σύνθεση και χαρακτηρισμός κάποιων συζυγιακών πολυμερών και των νανοσωματιδίων τους ήταν ο στόχος της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας με σκοπό να χρησιμοποιηθούν ως ιχνηθέτες φθορισμού στον καρκίνο και πιο συγκεκριμένα του παχέος εντέρου.

Έτσι έγινε σχεδιασμός και σύνθεση 3 συζυγιακών πολυμερών με δομή δότη-δέκτη (D-A) και αποτελούνται από βενζοδιθειφαίνιο, φαίνυλο- και θιένυλο-υποκατεστημένα ιντακενοδιθειοφαίνια ως μονάδες δότη και ως μονάδα δέκτη θα είναι και στις τρεις περιπτώσεις η διθειένο-πυρρολοδιόνη. Συμβολίζονται με BTTPD-Th (CP1), IDTDTPD-Ph (CP2) και IDTDTPD-Th (CP3) αντίστοιχα με τη σειρά της μονάδας δότη που αναφέρθηκε. Αφού χαρακτηρίστηκαν με ¹H-NMR, ¹³C-NMR, GPC, φασματοσκοπία UV-Vis και φθορισμού, αλλά και κάποιες θεωρητικές μελέτες μέσω Gaussian, έγινε κατασκευή των νανοσωματιδίων τους με 2 μεθόδους: την νανοκαταβύθιση και τον εγκλωβισμό με τη βοήθεια ενός αμφίφιλου συμπολυμερούς (πιο συγκεκριμένα το mPEG-b-PLGA). Αυτά χαρακτηρίστηκαν με DLS, δυναμικό zeta, φασματοσκοπία UV-Vis και φθορισμού, αλλά και μικροσκοπία AFM (μόνο στην περίπτωση των νανοσωματιδίων με νανοκαταβύθιση). Στη συνέχεια, τα νανοσωματίδια μέσω νανοκαταβύθισης μελετήθηκαν in vitro ως ιχνηθέτες φθορισμού σε καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου HCT-116 και σε υγιή ενδοθηλιακά κύτταρα HUVECs.

ABSTRACT

Going through the most difficult times in terms of health and diseases affecting the human species, it is extremely important for science and research to continue to study and improve existing therapies or to develop innovative ideas in the field of diagnosis and treatment. It is well known that early diagnosis is also the best way to fight any disease. Diseases, such as cancer, constantly occupy the entire scientific community as it is the second leading cause of death worldwide and is a diverse, aggressive disease that can affect people of all ages. By far, the most common forms of cancer are breast, prostate, lung or colon cancer. The development of technology and in particular nanotechnology and nanomedicine were based on a property of the Tumor Microenvironment (TME). More specifically, Enhanced Permeability and Retention (EPR) effect provides a very significant experimental advantage over existing methods, as nanoscale particles (nanoparticles) can penetrate through formed holes in cancer tissue, that are not present in healthy tissue.

Concerning the diagnostic tools that are provided, compounds with excellent optical properties are in demand. Such are photonic materials and specifically conjugated polymers that have proven to have excellent optoelectronic properties. Conjugated Polymers (CPs) have been shown to have unique optoelectronic properties due to their π -conjugated backbone. The highly delocalized π -electrons of the polymeric backbone enable high fluorescence brightness, high photostability and fast emission rates. CPs absorb and emit light energy not only in the UV-Vis region, but also in the NIR region, which is a distinct advantage in bioimaging techniques. CPs are known for not being water-soluble due to their hydrophobic nature to allow interaction with cells. However, strategies, such as nanoprecipitation or encapsulation, have been shown to be very effective in producing conjugated polymer nanoparticles (CPNs), that can be used in aqueous media. The advantages of CPNs include high brightness, excellent photostability, low cytotoxicity, high quantum yield and versatile surface modification.

The synthesis and characterization of some conjugated polymers and their nanoparticles, as well as the *in vitro* study of the NPs, were the aim of the present Master's thesis to be used as fluorescent probes in cancer and specifically in colon cancer. Alternating conjugated polymers were synthesized *via* metal catalyzed aromatic cross coupling Stille polymerization reaction. The synthesized donor-acceptor (D-A) CPs comprised thienyl substituted benzodithiaphene and tetraphenyl or tetrathienyl substituted-indacenodithiophene derivatives as electron donating unit moieties and dithienopyrrolodione derivative as electron withdrawing unit moieties (mentioned as BTTPD-Th/CP1, IDTDTPD-Ph/CP2 and IDTDTPD-Th/CP3 respectively). The average molecular weights by number and weight and the dispersity of the polymers were determined by Gel Permeation Chromatography (GPC) in ODCB. All polymers were analyzed via ^1H -NMR and ^{13}C -NMR, UV-Vis and fluorescence spectroscopy. NPs were formed *via* nanoprecipitation and encapsulation using an amphiphilic polymer (PLGA-b-mPEG). The shape of the nanoprecipitated NPs were investigated with Atomic Force Microscopy while Dynamic Light Scattering was exploited to elucidate the size of the nanoprecipitated and encapsulated NPs. More importantly, the quantum yields of the CPs and their NPs were calculated by fluorescence spectroscopy.

Last but not least, the in vitro experiments of the nanoprecipitated NPs were also performed in terms of the cell proliferation of cancer cells (HCT-116) and healthy endothelial cells isolated from umbilical cords (HUVECs), the internalization of the NPs in the same cell lines, the time points of internalization of the NPs in the HCT-116 cell line and where they are located in these cells after 24h of incubation. In addition, the secretion of the HCT-116 cells containing the NPs were examined up to day 4 of cell growth.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

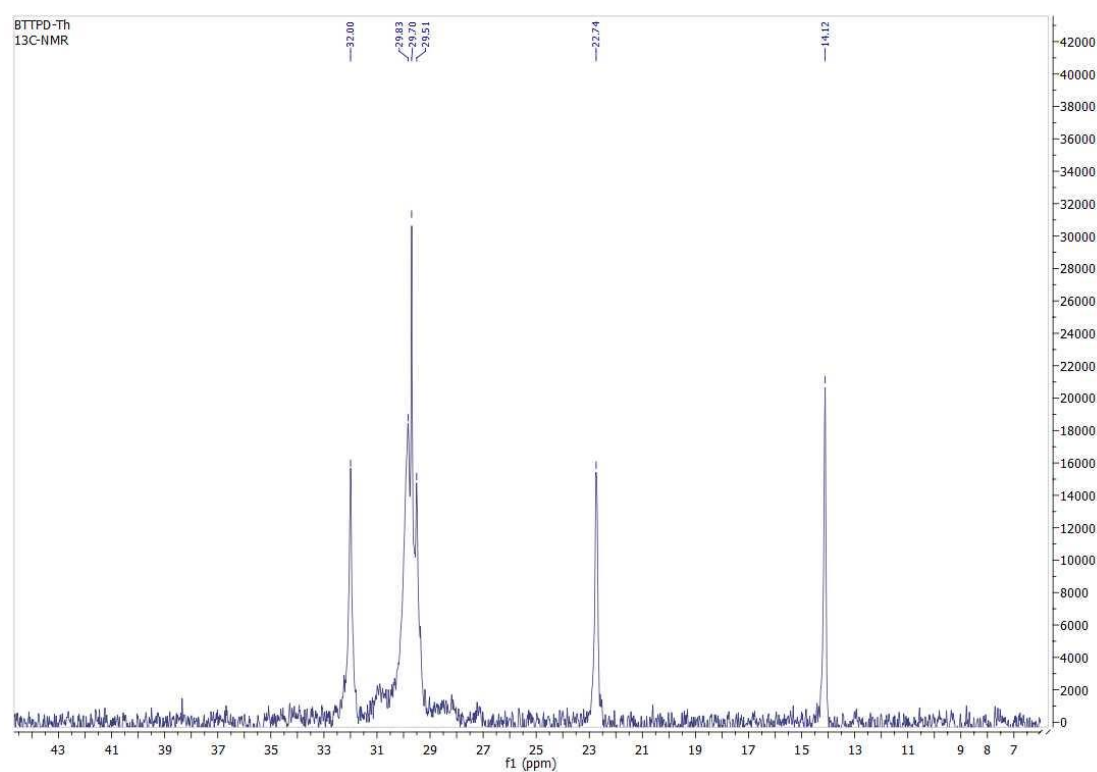
1. Stucchi, G., Battevi, N., Cairoli, S. & Consonni, D. The prevalence of musculoskeletal disorders in the retail sector: an Italian cross sectional study on 3380 workers. *Med. Lav.* **107**, 251–262 (2016).
2. Mbeunkui, F. & Johann, D. J. Cancer and the tumor microenvironment: A review of an essential relationship. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **63**, 571–582 (2009).
3. Liu, B. Conjugated Polymers for Biological and Biomedical Applications. *Conjugated Polymers for Biological and Biomedical Applications* (2018) doi:10.1002/9783527342747.
4. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **68**, 394–424 (2018).
5. DeVita, V. T. & Chu, E. A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res.* **68**, 8643–8653 (2008).
6. Mould, R. F. The discovery of radium in 1898 by Maria Sklodowska-Curie (1867-1934) and Pierre Curie (1859-1906) with commentary on their life and times. *Br. J. Radiol.* **71**, 1229–1254 (1998).
7. Andrews, J. R. *The radiobiology of human cancer radiotherapy*. (University Park Press, 1978).
8. Dai, Y., Xu, C., Sun, X. & Chen, X. Nanoparticle design strategies for enhanced anticancer therapy by exploiting the tumour microenvironment. *Chem. Soc. Rev.* **46**, 3830–3852 (2017).
9. Gort, E. H., Groot, A. J., Wall, E. Van Der, Diest, P. J. Van & Vooijs, M. A. Hypoxic Regulation of Metastasis via Hypoxia-Inducible Factors. *Curr. Mol. Med.* **8**, 60–67 (2008).
10. Roma-Rodrigues, C., Mendes, R., Baptista, P. V. & Fernandes, A. R. Targeting tumor microenvironment for cancer therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
11. Nichols, J. W. & Bae, Y. H. EPR: Evidence and fallacy. *J. Control. Release* **190**, 451–464 (2014).
12. Iyer, A. K., Khaled, G., Fang, J. & Maeda, H. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug Discov. Today* **11**, 812–818 (2006).
13. Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y. & Hori, K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: A review. *J. Control. Release* **65**, 271–284 (2000).
14. Kano, M. R. Nanotechnology and tumor microcirculation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **74**, 2–11 (2014).
15. Guo, B. *et al.* Molecular Engineering of Conjugated Polymers for Biocompatible Organic Nanoparticles with Highly Efficient Photoacoustic and

- Photothermal Performance in Cancer Theranostics. *ACS Nano* **11**, 10124–10134 (2017).
16. Singh, M., Singh, S., Prasad, S. & Gambhir, I. S. Nanotechnology in Medicine and Antibacterial Effect of Silver Nanoparticles. *Dig. J. Nanomater. Biostructure* **3**, 115–122 (2008).
 17. Yang, B., Chen, Y. & Shi, J. Exosome Biochemistry and Advanced Nanotechnology for Next-Generation Theranostic Platforms. *Adv. Mater.* **31**, 1–33 (2019).
 18. Hossein Baharvand and Nasser Aghdami. *Stem-Cell Nanoengineering Stem-Cell Nanoengineering*.
 19. Abelha, T. F., Dreiss, C. A., Green, M. A., Dailey, L. A. & Abelha, T. F. Conjugated polymers as nanoparticle probes for fluorescence and photoacoustic imaging. *J. Mater. Chem. B* **8**, 592–606 (2020).
 20. Wang, Y., Feng, L. & Wang, S. Conjugated Polymer Nanoparticles for Imaging, Cell Activity Regulation, and Therapy. *Adv. Funct. Mater.* **29**, 1–20 (2019).
 21. Donat-Bouillud, A. *et al.* Light-emitting diodes from fluorene-based π -conjugated polymers. *Chem. Mater.* **12**, 1931–1936 (2000).
 22. Leclerc, M. Optical and electrochemical transducers based on functionalized conjugated polymers. *Adv. Mater.* **11**, 1491–1498 (1999).
 23. Feng, X., Liu, L., Wang, S. & Zhu, D. Water-soluble fluorescent conjugated polymers and their interactions with biomacromolecules for sensitive biosensors. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 2411–2419 (2010).
 24. Zhou, H., Yang, L. & You, W. Rational design of high performance conjugated polymers for organic solar cells. *Macromolecules* **45**, 607–632 (2012).
 25. Kong, X., Kulkarni, A. P. & Jenekhe, S. A. Phenothiazine-Based Conjugated Polymers: Synthesis, Electrochemistry, and Light-Emitting Properties. *Macromolecules* **36**, 8992–8999 (2003).
 26. Kenry, Duan, Y. & Liu, B. Recent Advances of Optical Imaging in the Second Near-Infrared Window. *Adv. Mater.* **30**, 1–19 (2018).
 27. Mishra, S. Review on Nanomaterials and Their Utilization in the Recovery of Waste Mechanical Energy by Using Piezoelectric Nanogenerators. **8**, 1–6 (2019).
 28. Pedrotti, F. L., Pedrotti, L. M. & Pedrotti, L. S. Optical Properties of Materials. *Introd. to Opt.* 535–548 (2019) doi:10.1017/9781108552493.028.
 29. Kittel, C. *Introduction to Solid State Physics, 8th Edition*-. (Wiley).
 30. Terje A. Skotheim, J. R. *Handbook of Conducting Polymers CONJUGATED POLYMERS THEORY, SYNTHESIS, PROPERTIES, AND CHARACTERIZATION*. (CRC Press Taylor & Francis Group, 2007).
 31. Yeh, C. Applied Photonics. in *Applied Photonics* (ed. Yeh, C.) iv (Academic Press, 1994). doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-049926-0.50002-2>.

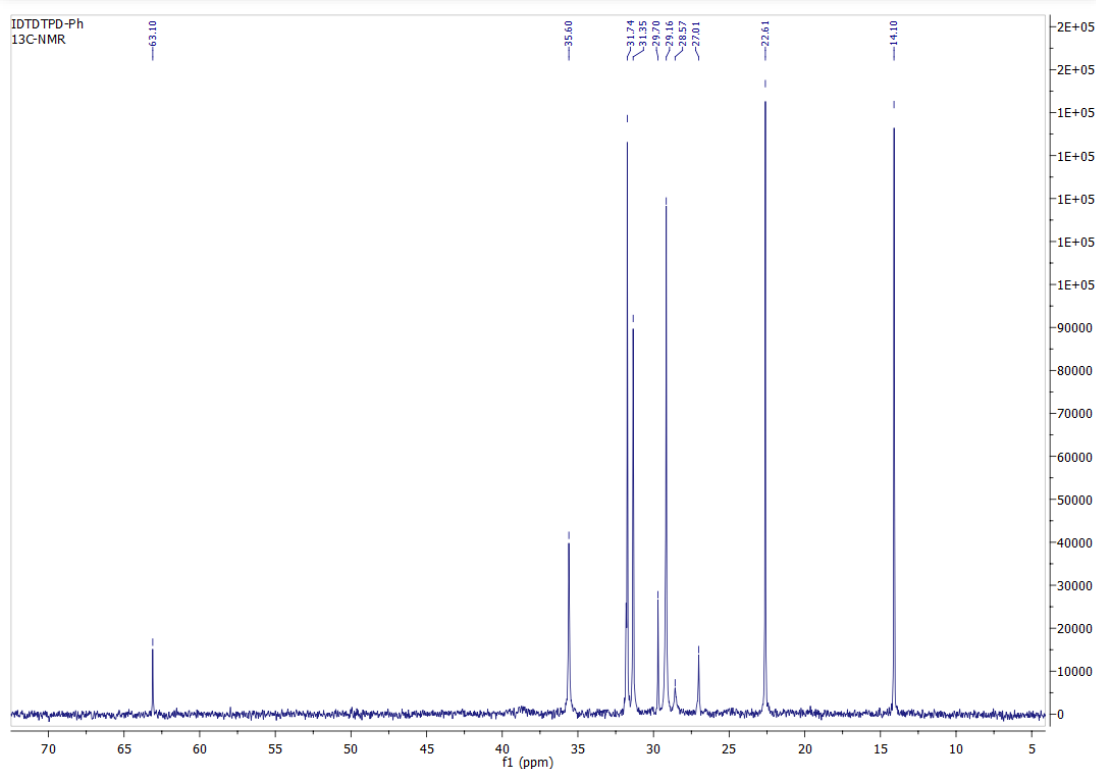
32. Quimby, R. S. *Photonics and Lasers: An Introduction*. *Photonics and Lasers: An Introduction* (John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey., 2006). doi:10.1002/0471791598.
33. Su, Y. W., Lin, Y. C. & Wei, K. H. Evolving molecular architectures of donor-acceptor conjugated polymers for photovoltaic applications: From one-dimensional to branched to two-dimensional structures. *J. Mater. Chem. A* **5**, 24051–24075 (2017).
34. Müllen, K. & Pisula, W. Donor-acceptor polymers. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 9503–9505 (2015).
35. Geng, J. *et al.* Biocompatible Conjugated Polymer Nanoparticles for Efficient Photothermal Tumor Therapy. *Small* **11**, 1603–1610 (2015).
36. Li, K. & Liu, B. Polymer encapsulated conjugated polymer nanoparticles for fluorescence bioimaging. *J. Mater. Chem.* **22**, 1257–1264 (2012).
37. Koralli, P. *et al.* New conjugated polymer nanoparticles with high photoluminescence quantum yields for far-red and near infrared fluorescence bioimaging. *Mater. Chem. Front.* **4**, 2357–2369 (2020).
38. Pecher, J. & Mecking, S. Nanoparticles of conjugated polymers. *Chem. Rev.* **110**, 6260–6279 (2010).
39. Zhu, C., Liu, L., Yang, Q., Lv, F. & Wang, S. Water-soluble conjugated polymers for imaging, diagnosis, and therapy. *Chem. Rev.* **112**, 4687–4735 (2012).
40. <https://www.topnewscorner.com/global-photoacoustic-imaging-market-developments-and-forecast-2018-2025/>.
41. Calixto, G. M. F. *et al.* Nanotechnology-based drug delivery systems for photodynamic therapy of cancer: A review. *Molecules* **21**, (2016).
42. Anguera, G. & Sánchez-García, D. Applications in Optoelectronics. *Afinidad* **71**, 8–20 (2014).
43. Campbell, S. A., Li, Y., Breakspear, S., Walsh, F. C. & Smith, J. R. Conducting polymer coatings in electrochemical technology Part 1 - Synthesis and fundamental aspects. *Trans. Inst. Met. Finish.* **85**, 237–244 (2007).
44. Cheng, Y. J., Yang, S. H. & Hsu, C. S. Synthesis of conjugated polymers for organic solar cell applications. *Chem. Rev.* **109**, 5868–5923 (2009).
45. Molnár, A. *Palladium-Catalyzed Coupling Reactions: Practical Aspects and Future Developments*. (2013 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA). doi:10.1002/9783527648283.
46. Allen J. Bard, L. R. F. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. (John Wiley and sons).
47. Mishra, R. K., Cherusseri, J., Bishnoi, A. & Thomas, S. *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. Spectroscopic Methods for Nanomaterials Characterization* vol. 2 (Elsevier Inc., 2017).
48. Giridhar, G., Manepalli, R. K. N. R. & Apparao, G. *Size-Exclusion Chromatography. Thermal and Rheological Measurement Techniques for*

49. Geil, P. H. Polymer characterization. *Mod. Text. Charact. Methods* 9–143 (2017) doi:10.1201/9780203746684.
50. Dragostin, O. & Profire, L. *Molecular weight of polymers used in biomedical applications. Characterization of Polymeric Biomaterials* (Elsevier Ltd., 2017). doi:10.1016/B978-0-08-100737-2.00005-4.
51. Nebhani, L. & Jaisingh, A. *Chemical analysis of polymers. Polymer Science and Innovative Applications* (INC, 2020). doi:10.1016/b978-0-12-816808-0.00003-2.
52. Bruce J. Berne, R. P. *Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics*. (Dover Publication, Inc, 2000).
53. Goldberg, W. I. Dynamic light scattering Dynamic light scattering. *Am. J. Phys.* **67**, 1152–1160 (1999).
54. Pate, K. & Safier, P. Chemical metrology methods for CMP quality. *Adv. Chem. Mech. Planarization* 1–325 (2016) doi:10.1016/B978-0-08-100165-3.00012-7.
55. Fernando, G. W. Chapter 5 Probing Layered Systems: A Brief Guide to Experimental Techniques. *Handb. Met. Phys.* **4**, 111–130 (2008).
56. Splinter, R. Action potential transmission and volume conduction. *Handb. Phys. Med. Biol.* **56**, 5-1-5–9 (2010).
57. Asmatulu, R. & Khan, W. S. Characterization of electrospun nanofibers. *Synth. Appl. Electrospun Nanofibers* 257–281 (2019) doi:10.1016/b978-0-12-813914-1.00013-4.
58. Giessibl, F. J. & Trafas, B. M. Piezoresistive cantilevers utilized for scanning tunneling and scanning force microscope in ultrahigh vacuum. *Rev. Sci. Instrum.* **65**, 1923–1929 (1994).
59. Ashutosh Sharma, S. G. S. Introduction to Fluorescence. *Principles of Fluorescence Spectroscopy* 1–26 (2006) doi:10.1007/978-0-387-46312-4_1.
60. Demas, J. N. & Crosby, G. A. The measurement of photoluminescence quantum yields. A review. *J. Phys. Chem.* **75**, 991–1024 (1971).
61. Kumar Panigrahi, S. & Kumar Mishra, A. Inner filter effect in fluorescence spectroscopy: As a problem and as a solution. *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* **41**, 100318 (2019).
62. Turro, N. J. *Modern Molecular Photochemistry*.
63. Peterson, D. A. Confocal Microscopy. *Encycl. Mov. Disord.* 250–252 (2010) doi:10.1016/B978-0-12-374105-9.00230-6.
64. Biczók, L. & Bérces, T. Temperature dependence of the rates of photophysical processes of fluorenone. *J. Phys. Chem.* **92**, 3842–3845 (1988).
65. Carlsson, S. R. & Fukuda, M. The poly(lactosaminoglycans of human lysosomal membrane glycoproteins lamp-1 and lamp-2. Localization on the peptide backbones. *J. Biol. Chem.* **265**, 20488–20495 (1990).

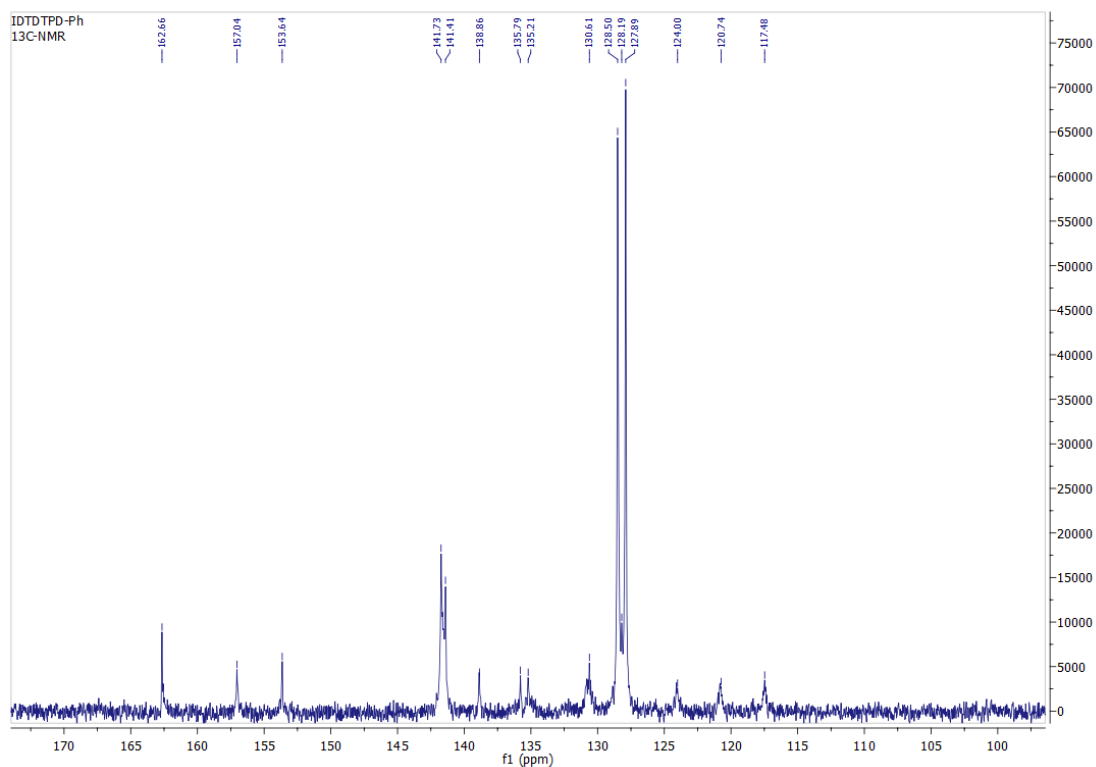
66. Pols, M. S. & Klumperman, J. Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Exp. Cell Res.* **315**, 1584–1592 (2009).
67. Jin, T. *et al.* Enhancement of aqueous stability and fluorescence brightness of indocyanine green using small calix[4]arene micelles for near-infrared fluorescence imaging. *Medchemcomm* **7**, 623–631 (2016).

Παράρτημα 1:

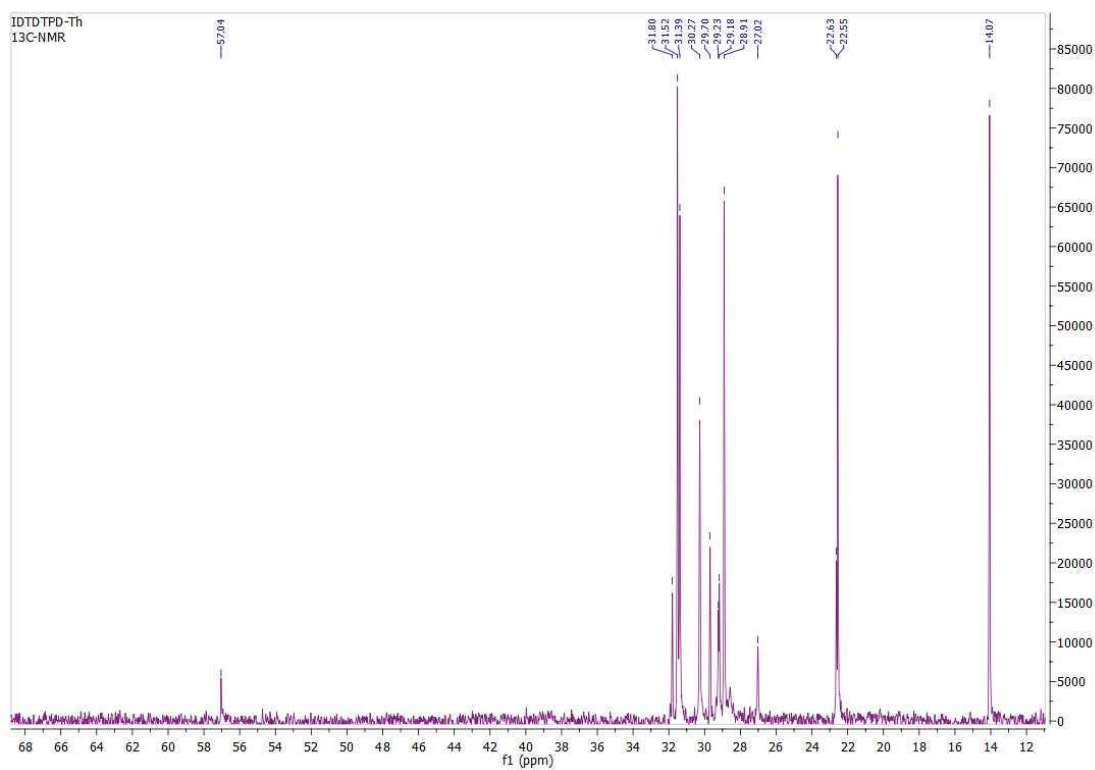
Σχήμα 1.1: Φάσμα ¹³C-NMR του BTTPD-Th/CP1 με μεγέθυνση σε 6-43 ppm



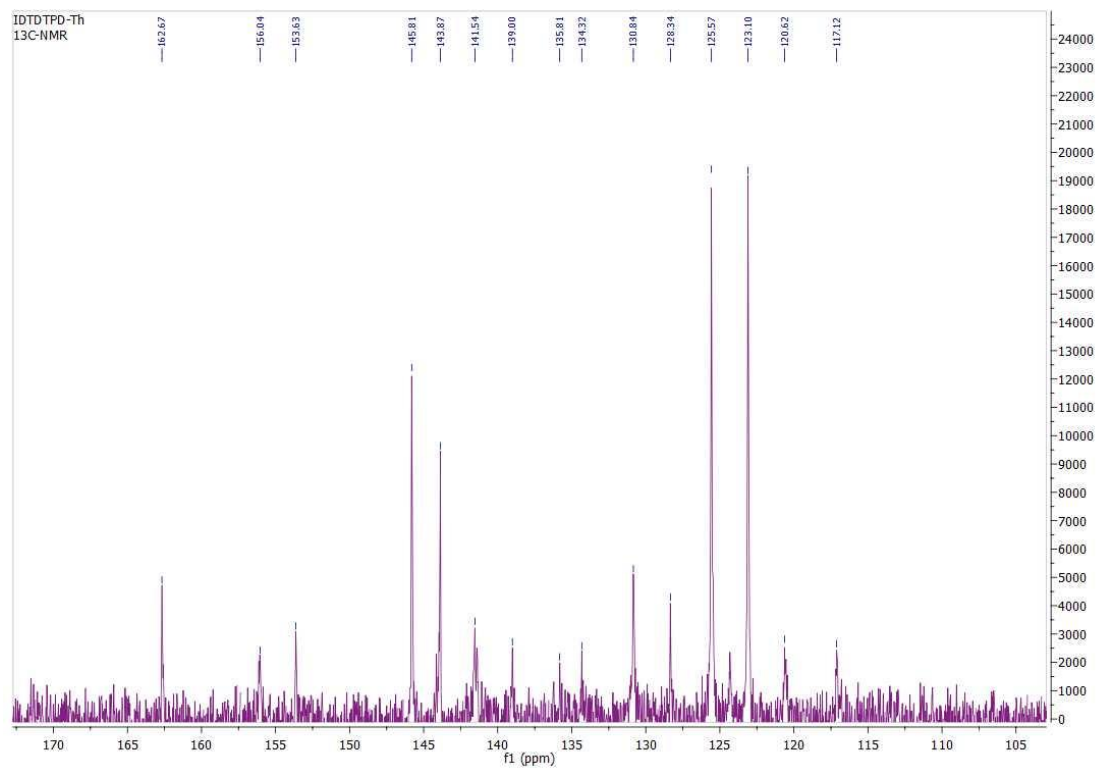
Σχήμα 1.2: Φάσμα ¹³C-NMR του IDTDTPD-Ph/CP2 με μεγέθυνση σε 5-70 ppm



Σχήμα 1.3: Φάσμα ^{13}C -NMR του IDTDTPD-Ph/CP2 με μεγέθυνση σε 100-170 ppm



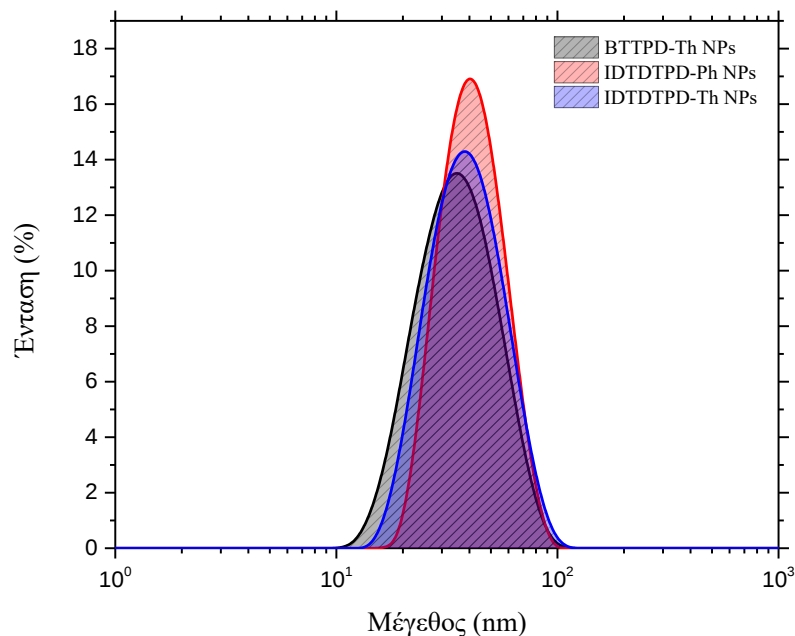
Σχήμα 1.4: Φάσμα ^{13}C -NMR του IDTDTPD-Th/CP3 με μεγέθυνση σε 12-60 ppm



Σχήμα 1.5: Φάσμα ^{13}C -NMR του IDTDTPD-Th/CP3 με μεγέθυνση σε 105-170 ppm

Παράρτημα 2:

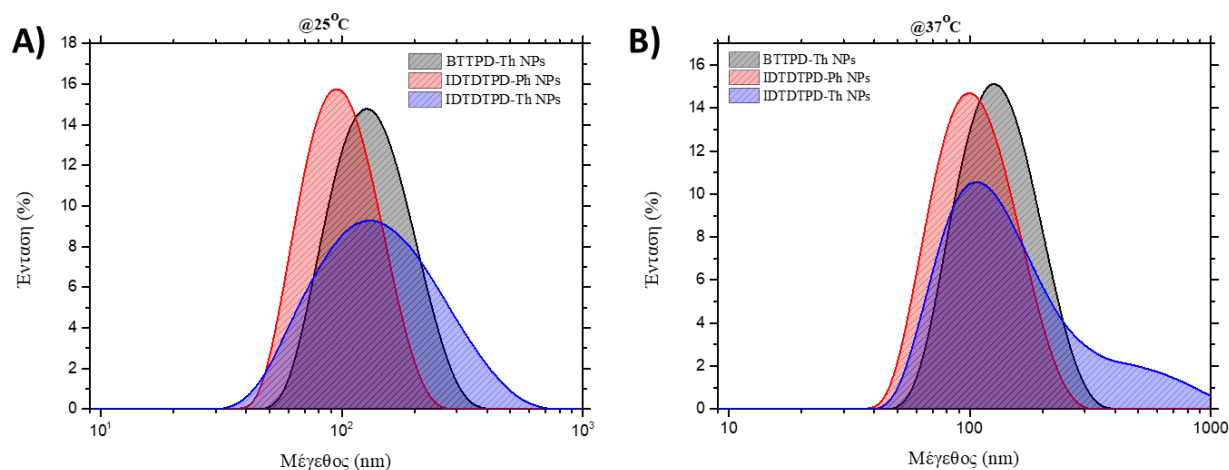
Σε αυτό το παράρτημα παρατίθενται τα διαγράμματα DLS των υπόλοιπων παρτίδων των nanoprecipitated NPs, καθώς και οι αντίστοιχοι πίνακες των μετρήσεων αυτών μαζί με τις μετρήσεις του δυναμικού zeta.



Σχήμα 2.1: Διάγραμμα δυναμικής σκέδασης φωτός, όπου αποδίδεται το ποσοστό των σκεδαζόμενων σωματιδίων συναρτήσει της έντασης της παρτίδας 1 των NPs στους 25°C

Δείγματα	DLS (25°C)				
	Z-Ave (nm)	PDI	PK1 mean (nm)	Z potential	Std dev
BTPD-Th	32.28 ± 0.02	0.125 ± 0.006	37.31 ± 0.24	-21,9	8,47
IDTDTPD-Ph	38.74 ± 0.19	0.083 ± 0.003	42.64 ± 0.071	-24,3	5,23
IDTDTPD-Th	35.75 ± 0.24	0.136 ± 0.011	40.88 ± 1.2	-25,3	7,12

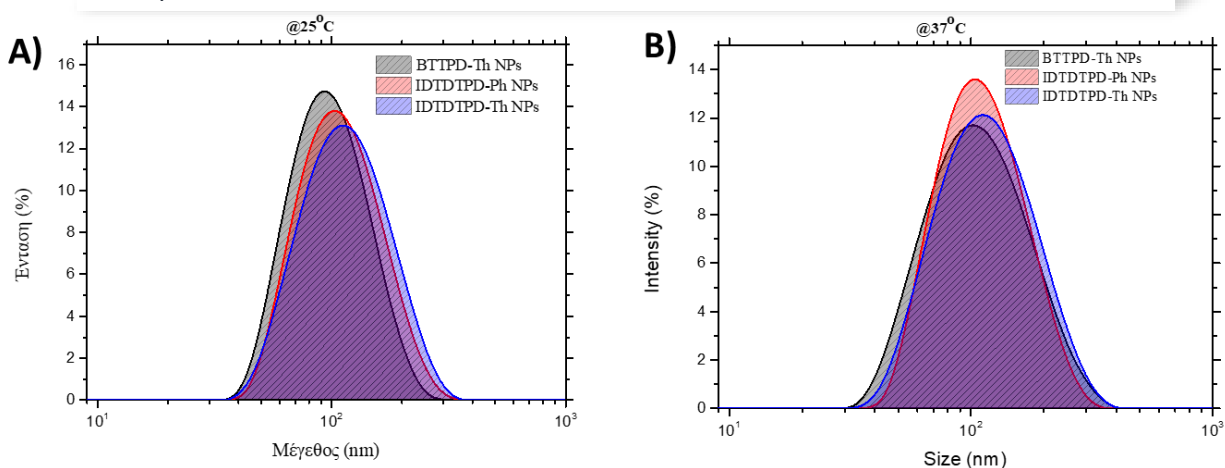
Πίνακας 2.1: Αποτελέσματα μετρήσεων DLS & δυναμικού zeta της παρτίδας 1 των NPs στους 25°C.



Σχήμα 2.2: Διάγραμμα δυναμικής σκέδασης φωτός, όπου αποδίδεται το ποσοστό των σκεδαζόμενων σωματιδίων συναρτήσει της έντασης της παρτίδας 2 των NPs στους **A)** 25°C και **B)** 37°C

Δείγματα	DLS (25°C)			DLS (37°C)				
	Z-Ave (nm)	PDI	PK1 mean (nm)	Z-Ave (nm)	PDI	PK1 mean (nm)	Z potential	Std dev
BTTPD-Th	123,93 ± 0,24	0,106 ± 0,02	139,13 ± 3,21	123,93 ± 0,38	0,142 ± 0,008	137,57 ± 0,96	-9,26	11,1
IDTDTPD-Ph	93,05 ± 0,44	0,1 ± 0,003	103,97 ± 0,8	96,47 ± 0,89	0,119 ± 0,001	109,43 ± 0,74	-13,6	8,89
IDTDTPD-Th	128,4 ± 0,65	0,253 ± 0,002	168,57 ± 4,18	132,37 ± 0,43	0,258 ± 0,006	191,2 ± 2,45	-28,1	8,66

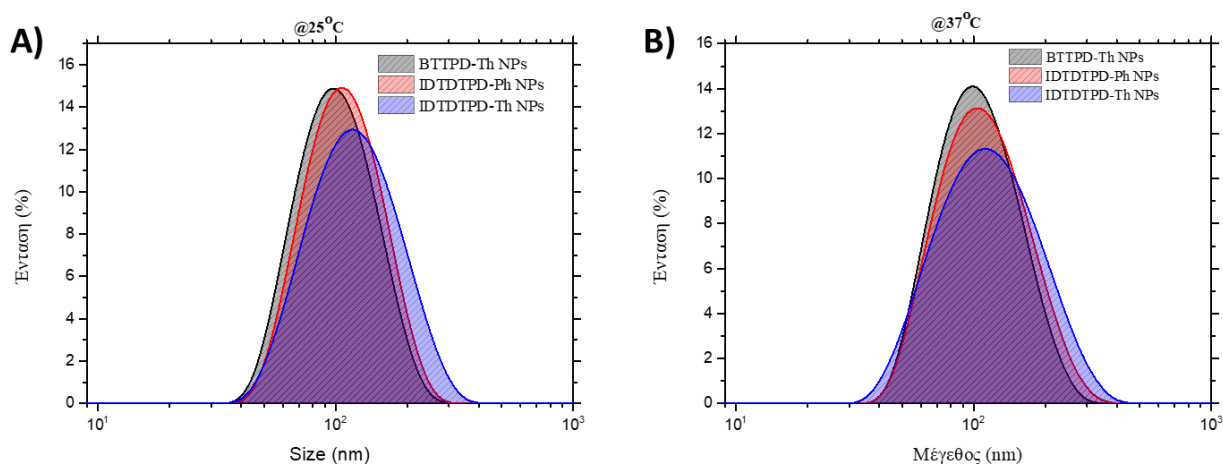
Πίνακας 2.2: Αποτελέσματα μετρήσεων DLS & δυναμικού zeta της παρτίδας 2 των NPs στους 25 και 37°C.



Σχήμα 2.3: Διάγραμμα δυναμικής σκέδασης φωτός, όπου αποδίδεται το ποσοστό των σκεδαζόμενων σωματιδίων συναρτήσει της έντασης της παρτίδας 3 των NPs στους **A)** 25°C και **B)** 37°C

Δείγματα	DLS (25°C)			DLS (37°C)				
	Z-Ave (nm)	PDI	PK1 mean (nm)	Z-Ave (nm)	PDI	PK1 mean (nm)	Z potential	Std dev
BTPD-Th	90,78 ± 0,55	0,121 ± 0,01	104,07 ± 2,03	95,78 ± 1,06	0,172 ± 0,016	109,8 ± 3,8	-24,5	8,46
IDTDPD-Ph	103,23 ± 0,47	0,143 ± 0,016	116,9 ± 0,95	102,7 ± 0,15	0,135 ± 0,002	119,83 ± 1,1	-26,4	10,5
IDTDPD-Th	103,4 ± 0,058	0,143 ± 0,002	121,97 ± 0,17	103,87 ± 0,6	0,164 ± 0,013	125,5 ± 2,29	-25,7	10,7

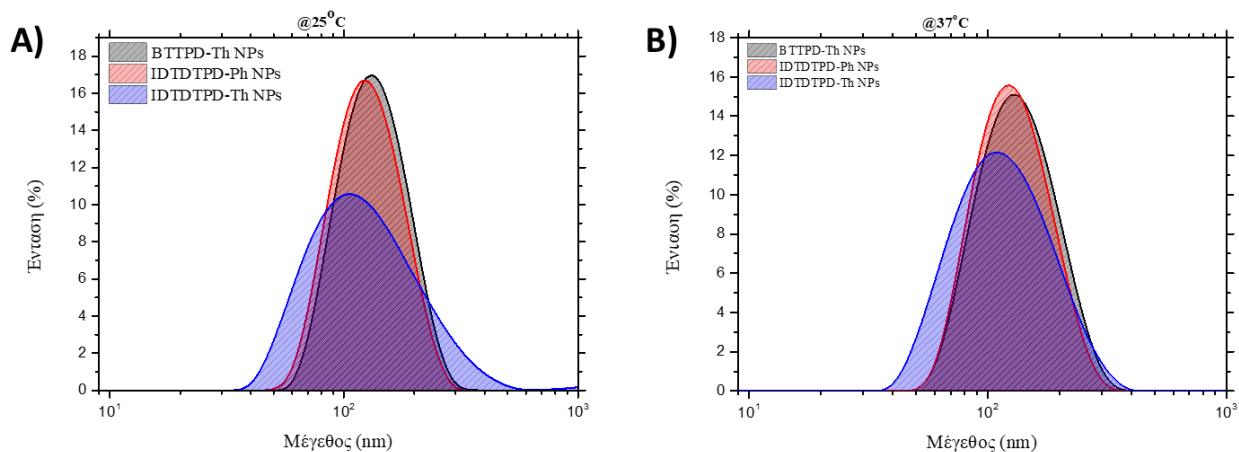
Πίνακας 2.3: Αποτελέσματα μετρήσεων DLS & δυναμικού zeta της παρτίδας 3 των NPs στους 25 και 37°C.



Σχήμα 2.4: Διάγραμμα δυναμικής σκέδασης φωτός, όπου αποδίδεται το ποσοστό των σκεδαζόμενων σωματιδίων συναρτήσει της έντασης της παρτίδας 4 των NPs στους **A)** 25°C και **B)** 37°C

Δείγματα	DLS (25°C)			DLS (37°C)				
	Z-Ave (nm)	PDI	PK1 mean (nm)	Z-Ave (nm)	PDI	PK1 mean (nm)	Z potential	Std dev
BTPD-Th	94,59 ± 0,43	0,117 ± 0,005	107,3 ± 1,11	96,69 ± 0,26	0,126 ± 0,002	107,07 ± 1,75	-24,7	9,91
IDTDPD-Ph	101,03 ± 0,29	0,104 ± 0,009	113,77 ± 1,39	103,9 ± 1,15	0,147 ± 0,009	121,23 ± 2,04	-14,7	12,9
IDTDPD-Th	107,1 ± 0,36	0,164 ± 0,006	129,57 ± 0,92	102,97 ± 0,23	0,165 ± 0,005	122,03 ± 3,14	-23,5	8,36

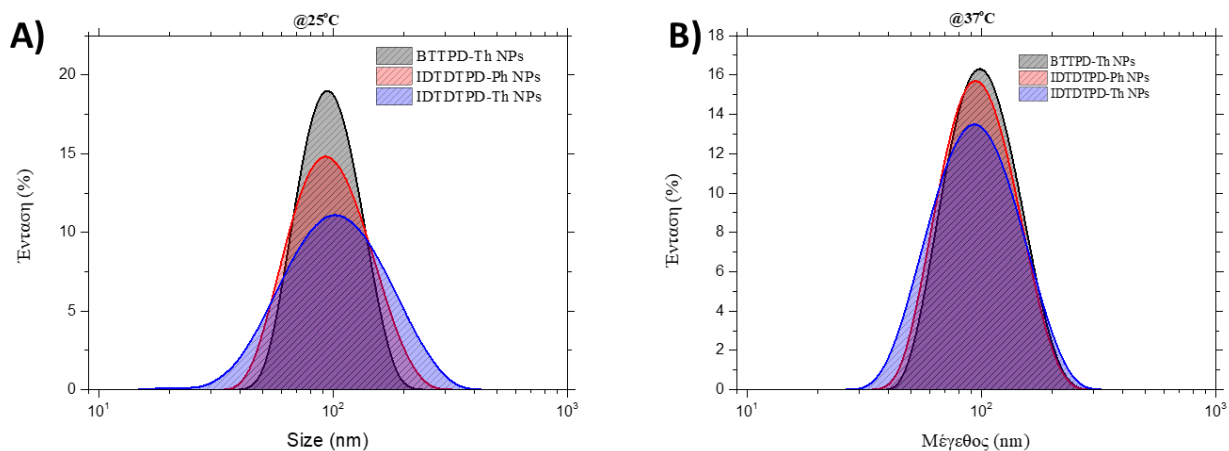
Πίνακας 2.4: Αποτελέσματα μετρήσεων DLS & δυναμικού zeta της παρτίδας 4 των NPs στους 25 και 37°C.



Σχήμα 2.5: Διάγραμμα δυναμικής σκέδασης φωτός, όπου αποδίδεται το ποσοστό των σκεδαζόμενων σωματιδίων συναρτήσει της έντασης της παρτίδας 5 των NPs στους **A)** 25°C και **B)** 37°C

Δείγματα	DLS (25°C)			DLS (37°C)				
	Z-Ave (nm)	PDI	PK1 mean (nm)	Z-Ave (nm)	PDI	PK1 mean (nm)	Z potential	Std dev
B TTPD-Th	125,87 ± 0,42	0,101 ± 0,016	139,23 ± 0,5	125,67 ± 0,79	0,102 ± 0,008	141,23 ± 1,17	-29,6	10,2
IDT DTPD-Ph	118,57 ± 0,58	0,1 ± 0,011	130,7 ± 0,36	123,4 ± 0,15	0,181 ± 0,027	129,73 ± 6,24	-20,8	8,51
IDT DTPD-Th	112,9 ± 0,72	0,224 ± 0,006	144,27 ± 4,86	105,4 ± 0,1	0,159 ± 0,003	123,5 ± 2,45	-22,4	9,95

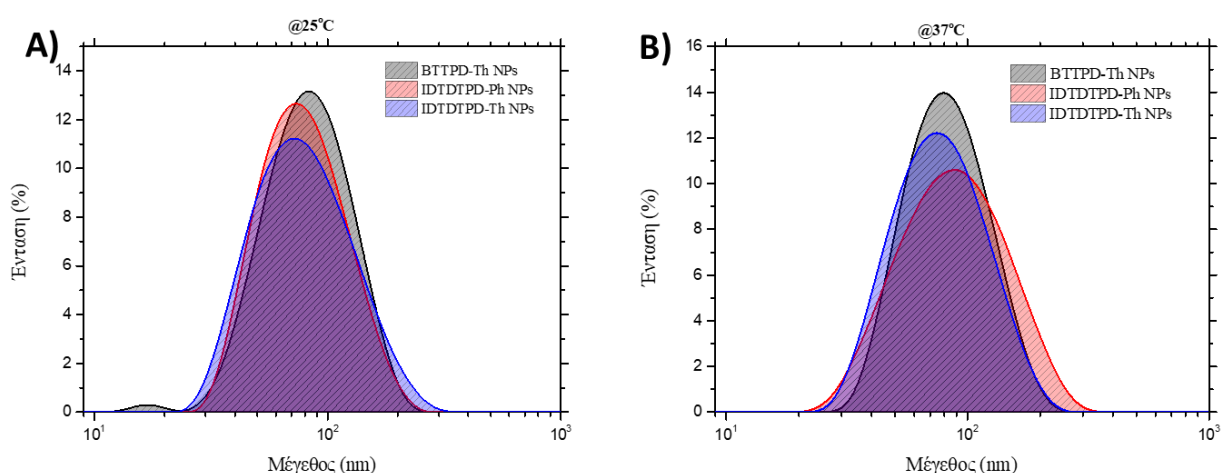
Πίνακας 2.5: Αποτελέσματα μετρήσεων DLS & δυναμικού zeta της παρτίδας 5 των NPs στους 25 και 37°C.



Σχήμα 2.6: Διάγραμμα δυναμικής σκέδασης φωτός, όπου αποδίδεται το ποσοστό των σκεδαζόμενων σωματιδίων συναρτήσει της έντασης της παρτίδας 6 των NPs στους **A)** 25°C και **B)** 37°C

Δείγματα	DLS (25°C)			DLS (37°C)				
	Z-Ave (nm)	PDI	PK1 mean (nm)	Z-Ave (nm)	PDI	PK1 mean (nm)	Z potential	Std dev
BTPD-Th	92,6 ± 0,57	0,07 ± 0,005	100,62 ± 1,49	95,23 ± 1,06	0,098 ± 0,008	106,23 ± 2,21	-38,1	11,2
IDTDPD-Ph	91,62 ± 0,41	0,12 ± 0,009	102,9 ± 0,46	91,87 ± 0,4	0,1 ± 0,007	102,93 ± 1,09	-35,5	10,3
IDTDPD-Th	94,83 ± 0,72	0,208 ± 0,014	106 ± 3,51	91,94 ± 0,42	0,186 ± 0,013	103,97 ± 3,38	-48,5	11,0

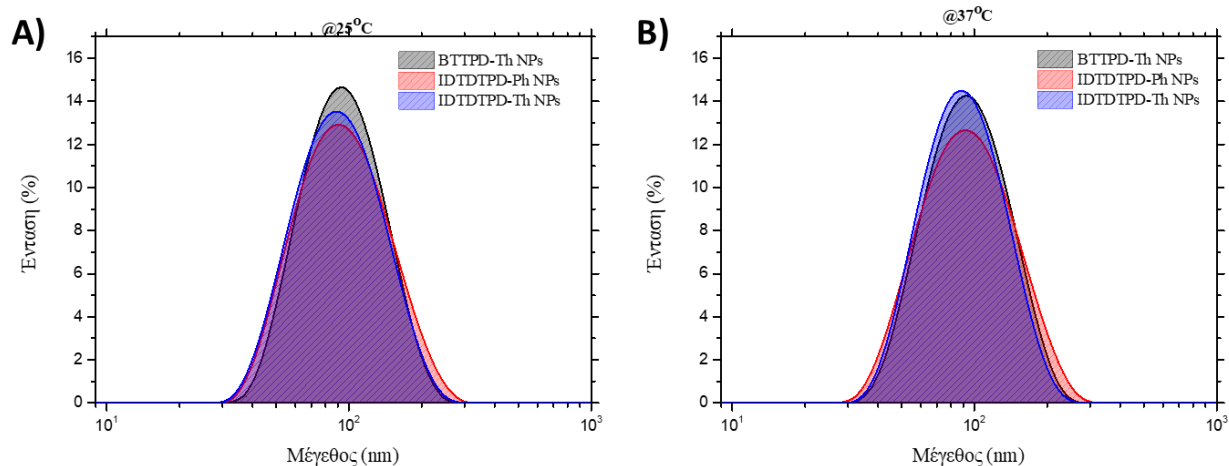
Πίνακας 2.6: Αποτελέσματα μετρήσεων DLS & δυναμικού zeta της παρτίδας 6 των NPs στους 25 και 37°C.



Σχήμα 2.7: Διάγραμμα δυναμικής σκέδασης φωτός, όπου αποδίδεται το ποσοστό των σκεδαζόμενων σωματιδίων συναρτήσει της έντασης της παρτίδας 7 των NPs στους **A)** 25°C και **B)** 37°C

Δείγματα	DLS (25°C)			DLS (37°C)				
	Z-Ave (nm)	PDI	PK1 mean (nm)	Z-Ave (nm)	PDI	PK1 mean (nm)	Z potential	Std dev
BTPD-Th	75,16 ± 0,53	0,15 ± 0,011	88,95 ± 0,97	75,97 ± 0,26	0,159 ± 0,005	86,92 ± 2,12	-32,2	10,3
IDTDPD-Ph	76,83 ± 2,03	0,207 ± 0,017	89,02 ± 2,47	82,96 ± 1,31	0,253 ± 0,013	95,92 ± 2,98	-28,2	6,26
IDTDPD-Th	72,96 ± 0,94	0,205 ± 0,011	84,01 ± 1,67	73,23 ± 0,45	0,21 ± 0,01	81,01 ± 1,78	-26,0	7,56

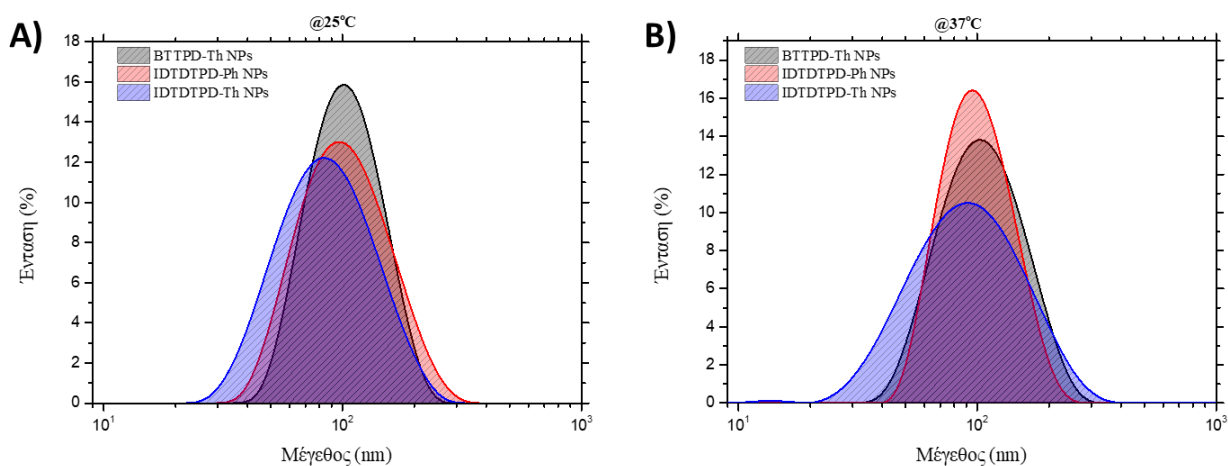
Πίνακας 2.7: Αποτελέσματα μετρήσεων DLS & δυναμικού zeta της παρτίδας 7 των NPs στους 25 και 37°C.



Σχήμα 2.8 Διάγραμμα δυναμικής σκέδασης φωτός, όπου αποδίδεται το ποσοστό των σκεδαζόμενων σωματιδίων συναρτήσει της έντασης της παρτίδας 8 των NPs στους **A)** 25°C και **B)** 37°C

Δείγματα	DLS (25°C)			DLS (37°C)				
	Z-Ave (nm)	PDI	PK1 mean (nm)	Z-Ave (nm)	PDI	PK1 mean (nm)	Z potential	Std dev
BTTPD-Th	86,4 ± 0,044	0,118 ± 0,002	99,21 ± 0,35	87,64 ± 0,12	0,116 ± 0,01	100,45 ± 1,18	-31,5	25
IDTDTPD-Ph	85,66 ± 0,19	0,14 ± 0,003	101,17 ± 0,27	86,62 ± 0,13	0,138 ± 0,006	101,9 ± 0,83	-29,5	21,6
IDTDTPD-Th	82,79 ± 0,09	0,124 ± 0,008	95,47 ± 1,01	84,09 ± 0,09	0,123 ± 0,007	96,96 ± 0,66	-32,3	20,4

Πίνακας 2.8: Αποτελέσματα μετρήσεων DLS & δυναμικού zeta της παρτίδας 8 των NPs στους 25 και 37°C.



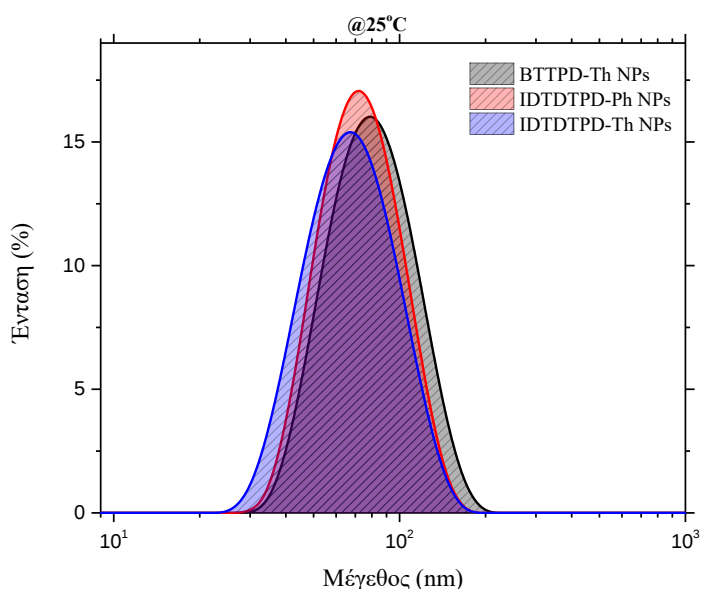
Σχήμα 2.9: Διάγραμμα δυναμικής σκέδασης φωτός, όπου αποδίδεται το ποσοστό των σκεδαζόμενων σωματιδίων συναρτήσει της έντασης της παρτίδας 12 των NPs στους **A)** 25°C και **B)** 37°C

Δείγματα	DLS (25°C)			DLS (37°C)				
	Z-Ave (nm)	PDI	PK1 mean (nm)	Z-Ave (nm)	PDI	PK1 mean (nm)	Z potential	Std dev
BTTPD-Th	96,08 ± 0,33	0,104 ± 0,007	108,4 ± 0,74	96,9 ± 0,14	0,11 ± 0,006	110,17 ± 0,56	-44,2	9,75
IDTDTPD-Ph	94,05 ± 0,2	0,137 ± 0,01	109,77 ± 0,78	95,14 ± 0,19	0,12 ± 0,004	107,77 ± 2,04	-41,9	7,93
IDTDTPD-Th	77,94 ± 0,64	0,196 ± 0,005	91,4 ± 1,37	79,09 ± 0,41	0,19 ± 0,002	97,24 ± 2,63	-42,5	6,4

Πίνακας 2.9: Αποτελέσματα μετρήσεων DLS & δυναμικού zeta της παρτίδας 12 των NPs στους 25 και 37°C.

Παράρτημα 3:

Σε αυτό το παράρτημα παρατίθενται τα διαγράμματα DLS της παρτίδας των encapsulated NPs, καθώς και ο αντίστοιχος πίνακας των μετρήσεων αυτών μαζί με τις μετρήσεις του δυναμικού zeta. Η παρτίδα αυτή κατασκευάστηκε στην αρχή των πειραμάτων και δεν μπόρεσε να χρησιμοποιηθεί σε κάποια μέτρηση, διότι έκλεισαν μετά τα εργαστήρια λόγω καραντίνας της πανδημίας του κορωνοϊού. Μετά από 4 μήνες δεν ήταν διαυγές διάλυμα πλέον.



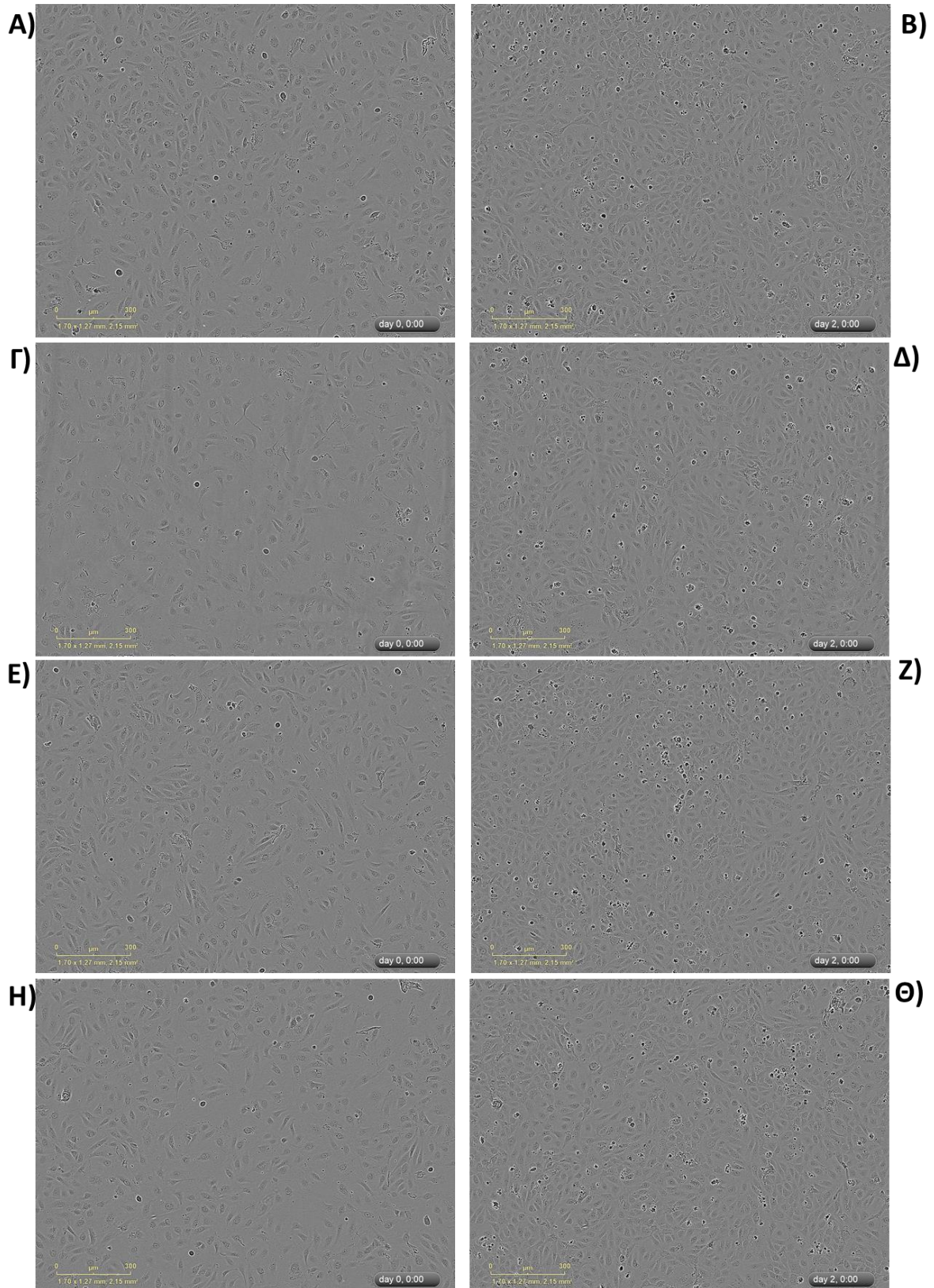
Σχήμα 3.1: Διάγραμμα δυναμικής σκέδασης φωτός, όπου αποδίδεται το ποσοστό των σκεδαζόμενων σωματιδίων συναρτήσει της έντασης της παρτίδας 1 των NPs στους 25°C.

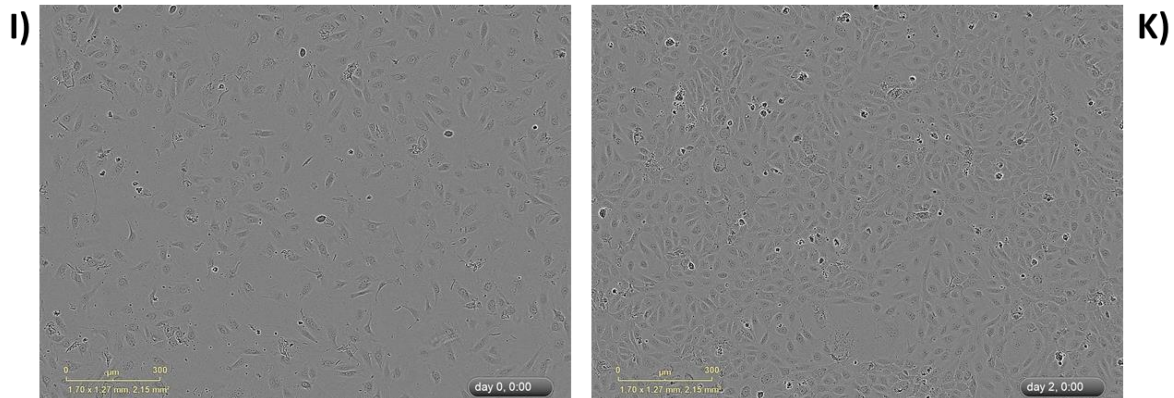
Δείγματα	DLS (25°C)			Z potential	Std dev
	Z-Ave (nm)	PDI	PK1 mean (nm)		
BTTPD-Th	74.93 ± 0.24	0.085 ± 0.006	82.77 ± 0.18	-16,4	8,39
IDTDTPD-Ph	69.21 ± 0.15	0.082 ± 0.007	76.52 ± 0.67	-15,4	9,63
IDTDTPD-Th	63.53 ± 0.069	0.086 ± 0.004	70.72 ± 0.13	-16,7	9,42

Πίνακας 3.1: Αποτελέσματα μετρήσεων DLS & δυναμικού zeta της παρτίδας 1 των NPs στους 25°C.

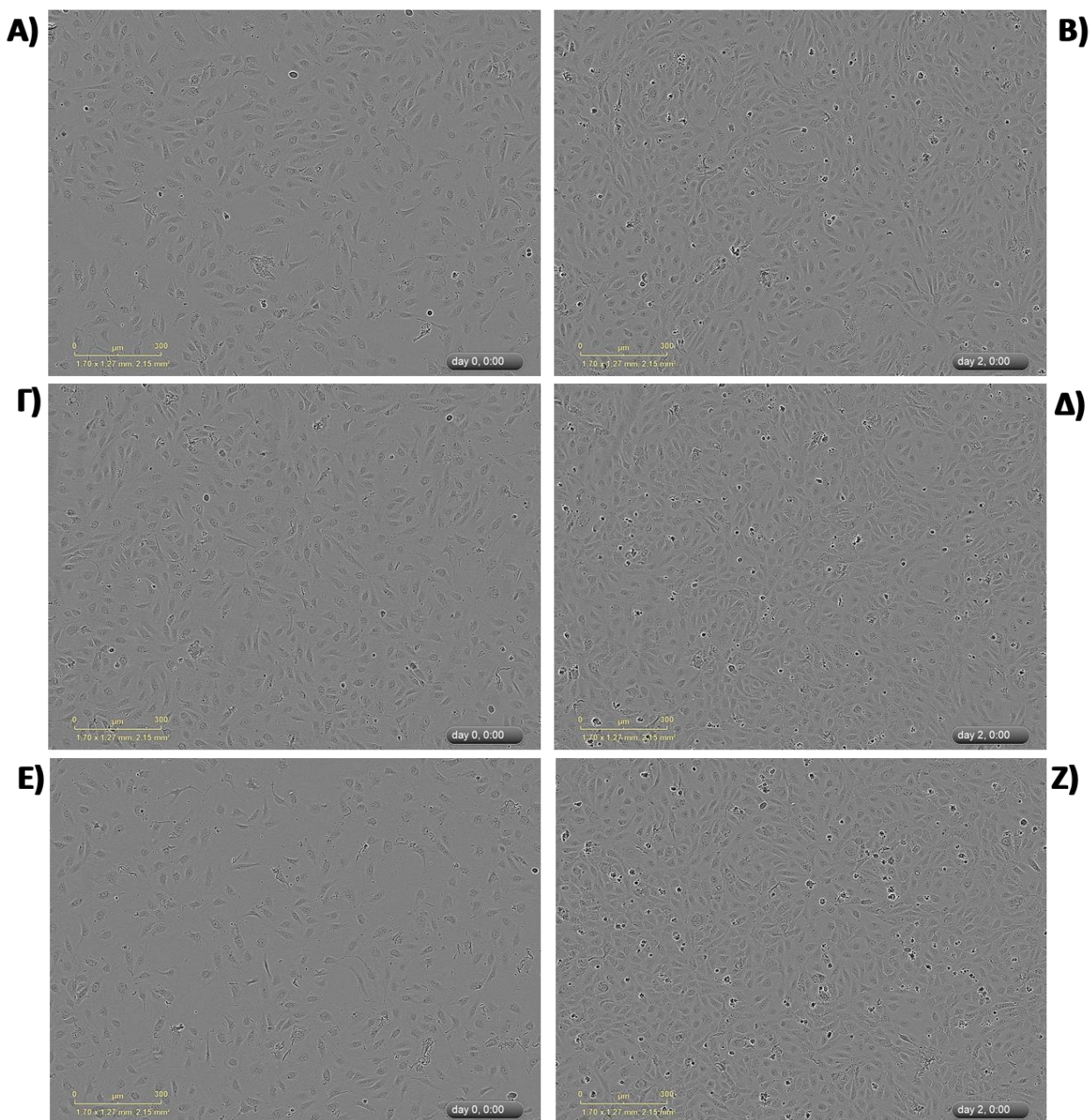
Παράρτημα 4:

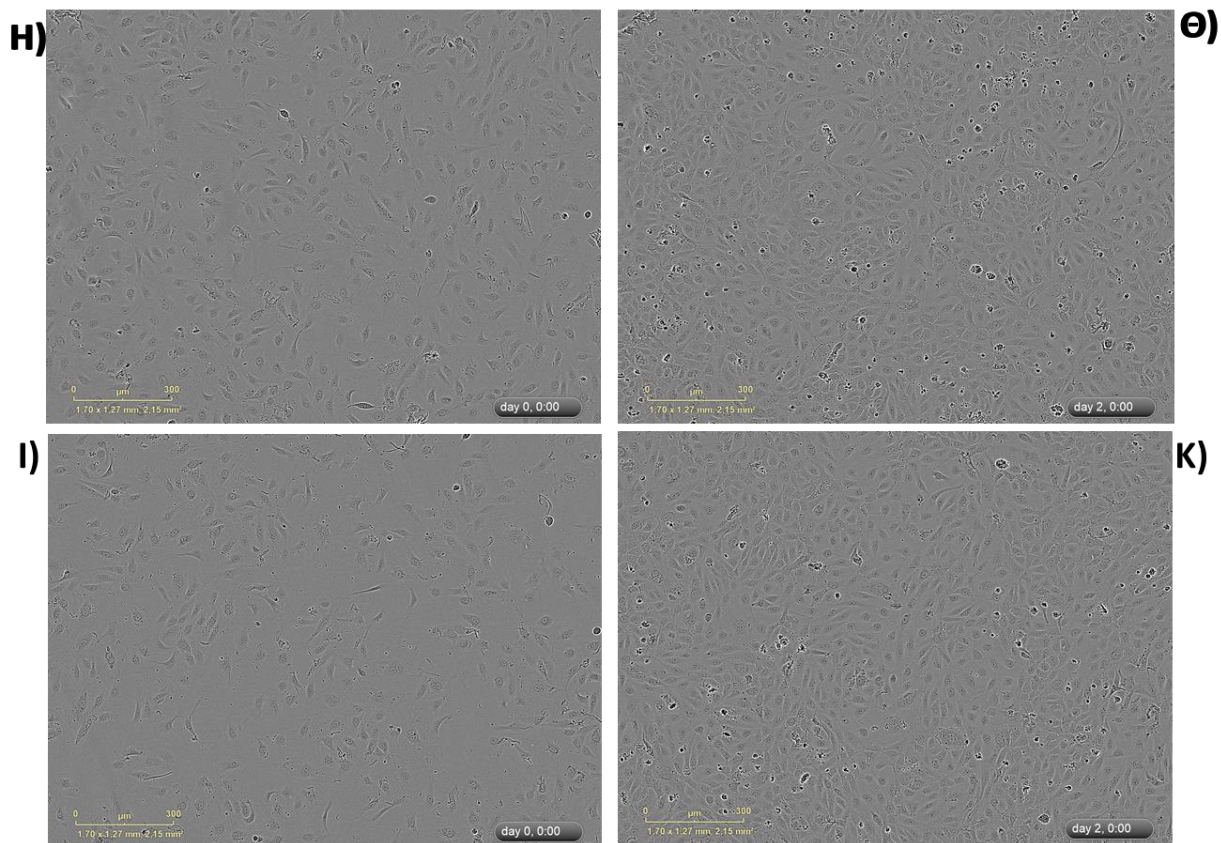
Αναρτιούνται παρακάτω φωτογραφίες κυτταρικής ανάπτυξης από το IncuCyte για τα κύτταρα HUVECs και HCT-116 για τις συγκεντρώσεις 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0325 και 0.0156μg/ml των nanoprecipitated CPNs, καθώς και των αντίστοιχων κυττάρων χωρίς παρουσία κάποιας ουσίας.



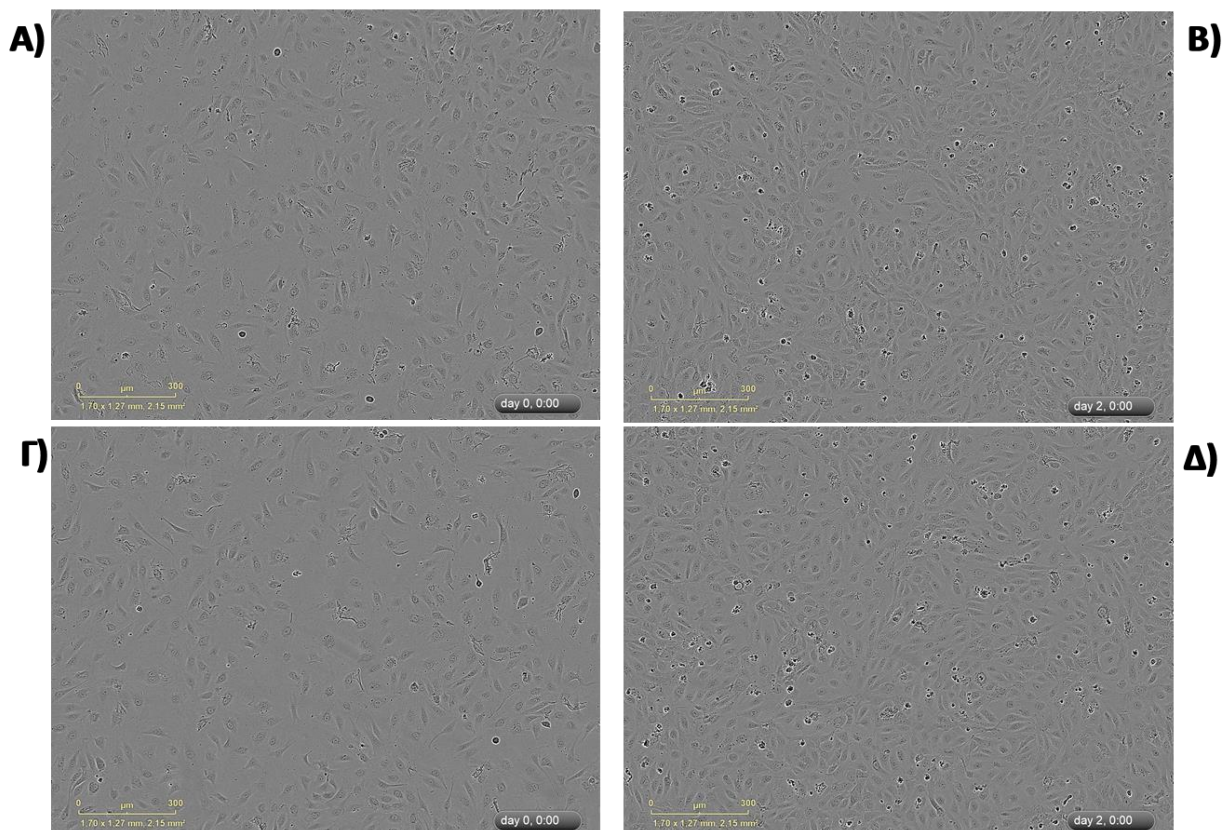


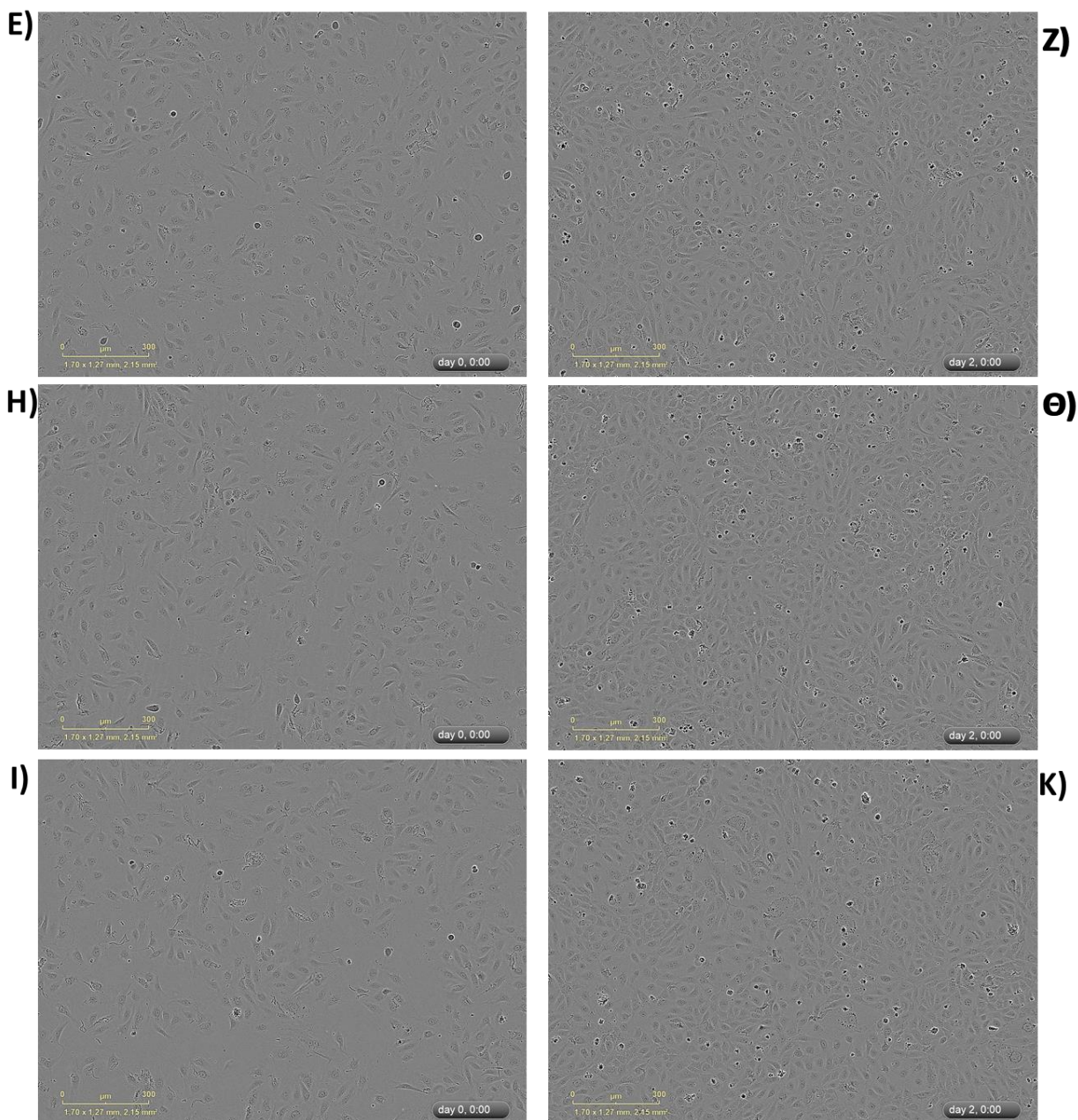
Εικόνα 4.1: Απεικόνιση HUVECs κυττάρων με προσθήκη BTTPD-Th NPs συγκέντρωσης **A)** 0,25μg/ml στις 0h, **B)** 0,25μg/ml στις 48h, **Γ)** 0,125μg/ml στις 0h, **Δ)** 0,125μg/ml στις 48h, **Ε)** 0,0625μg/ml στις 0h, **Ζ)** 0,0625μg/ml στις 48h, **Η)** 0,0325μg/ml στις 0h, **Θ)** 0,0325μg/ml στις 48h, **Ι)** 0,0156μg/ml στις 0h, **Κ)** 0,0156μg/ml στις 48h





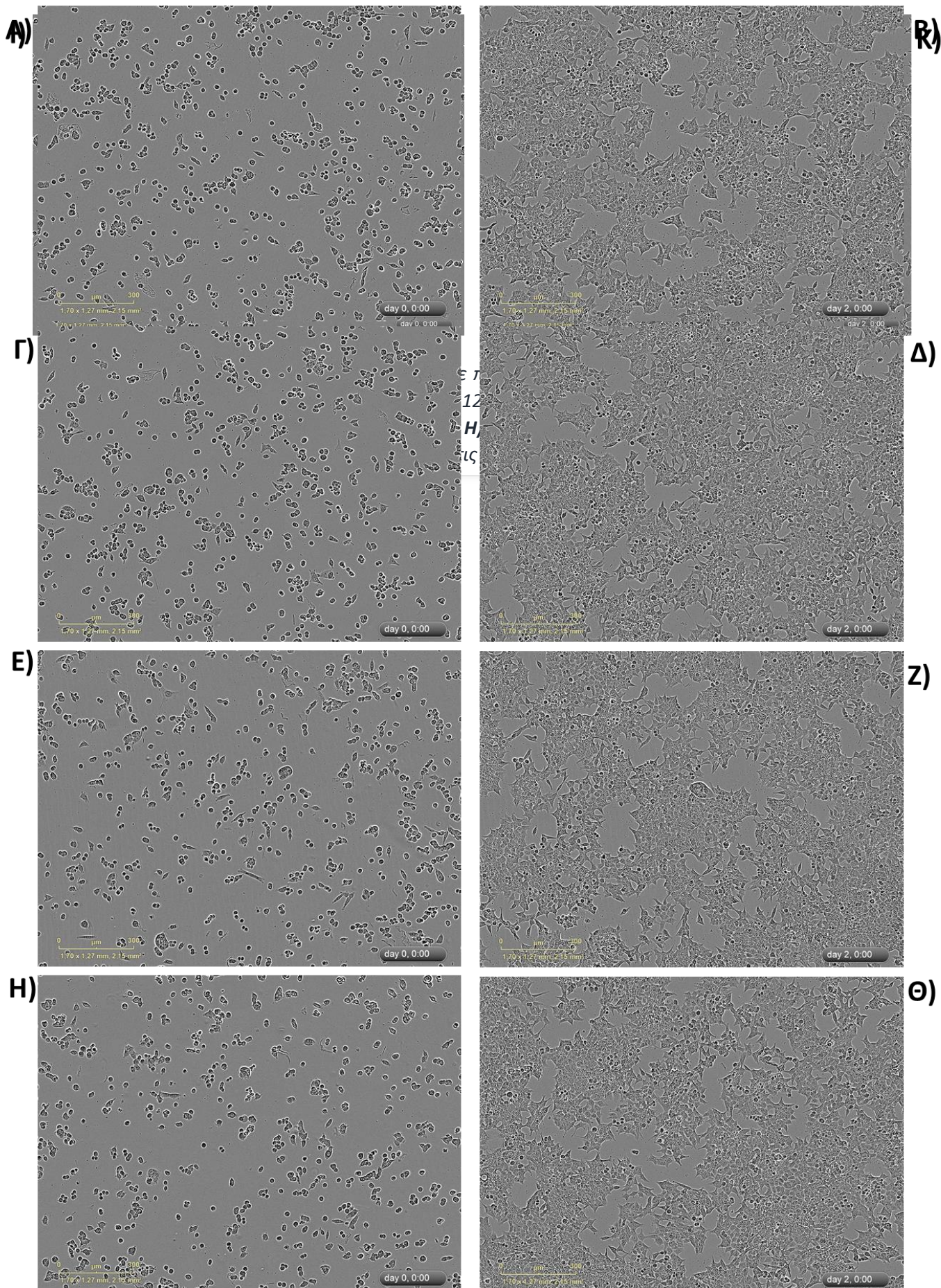
Εικόνα 4.2: Απεικόνιση HUVECs κυττάρων με προσθήκη IDTDTDP-Ph NPs συγκέντρωσης **A)** 0,25µg/ml στις 0h, **B)** 0,25µg/ml στις 48h, **Γ)** 0,125µg/ml στις 0h, **Δ)** 0,125µg/ml στις 48h, **Ε)** 0,0625µg/ml στις 0h, **Ζ)** 0,0625µg/ml στις 48h, **Η)** 0,0325µg/ml στις 0h, **Θ)** 0,0325µg/ml στις 48h, **Ι)** 0,0156µg/ml στις 0h, **Κ)** 0,0156µg/ml στις 48h



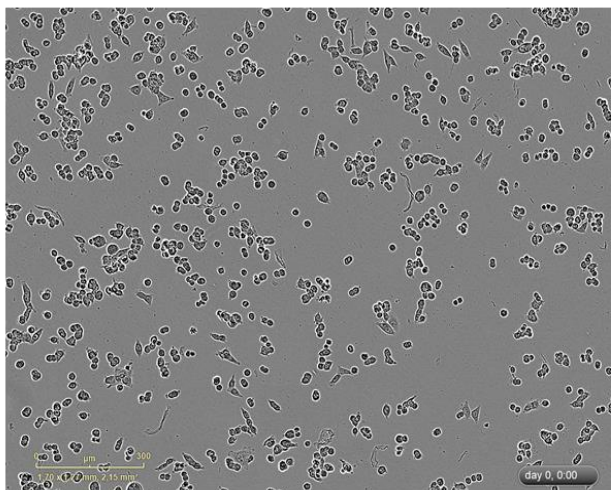


Εικόνα 4.3: Απεικόνιση HUVECs κυττάρων με προσθήκη IDTDTPD-Th NPs συγκέντρωσης **A)** 0,25µg/ml στις 0h, **B)** 0,25µg/ml στις 48h, **Γ)** 0,125µg/ml στις 0h, **Δ)** 0,125µg/ml στις 48h, **Ε)** 0,0625µg/ml στις 0h, **Ζ)** 0,0625µg/ml στις 48h, **Η)** 0,0325µg/ml στις 0h, **Θ)** 0,0325µg/ml στις 48h, **Ι)** 0,0156µg/ml στις 0h, **Κ)** 0,0156µg/ml στις 48h

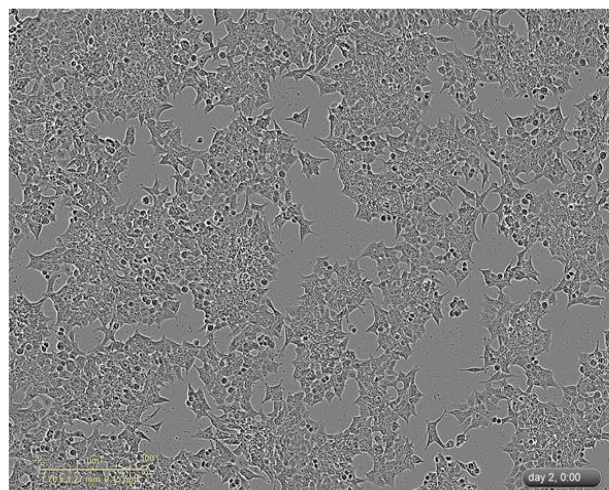
Ακολουθεί για τη κυτταρικής σειρά HCT-116:



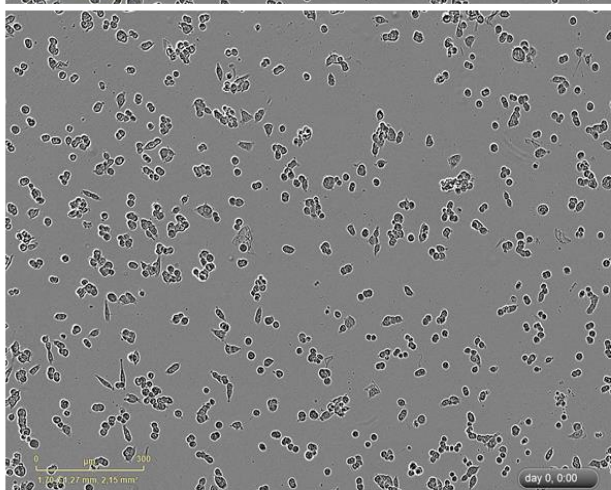
A)



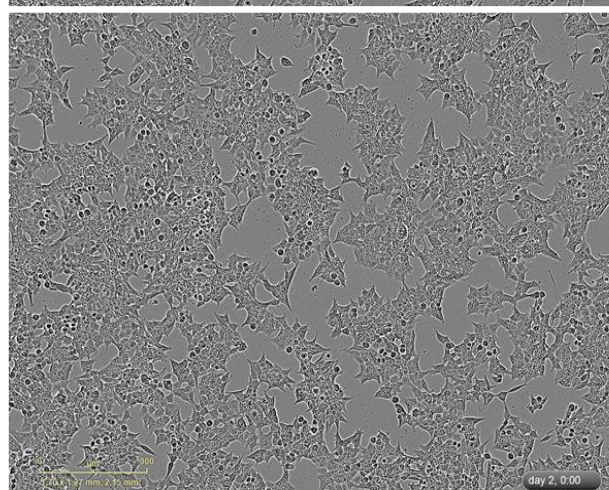
B)

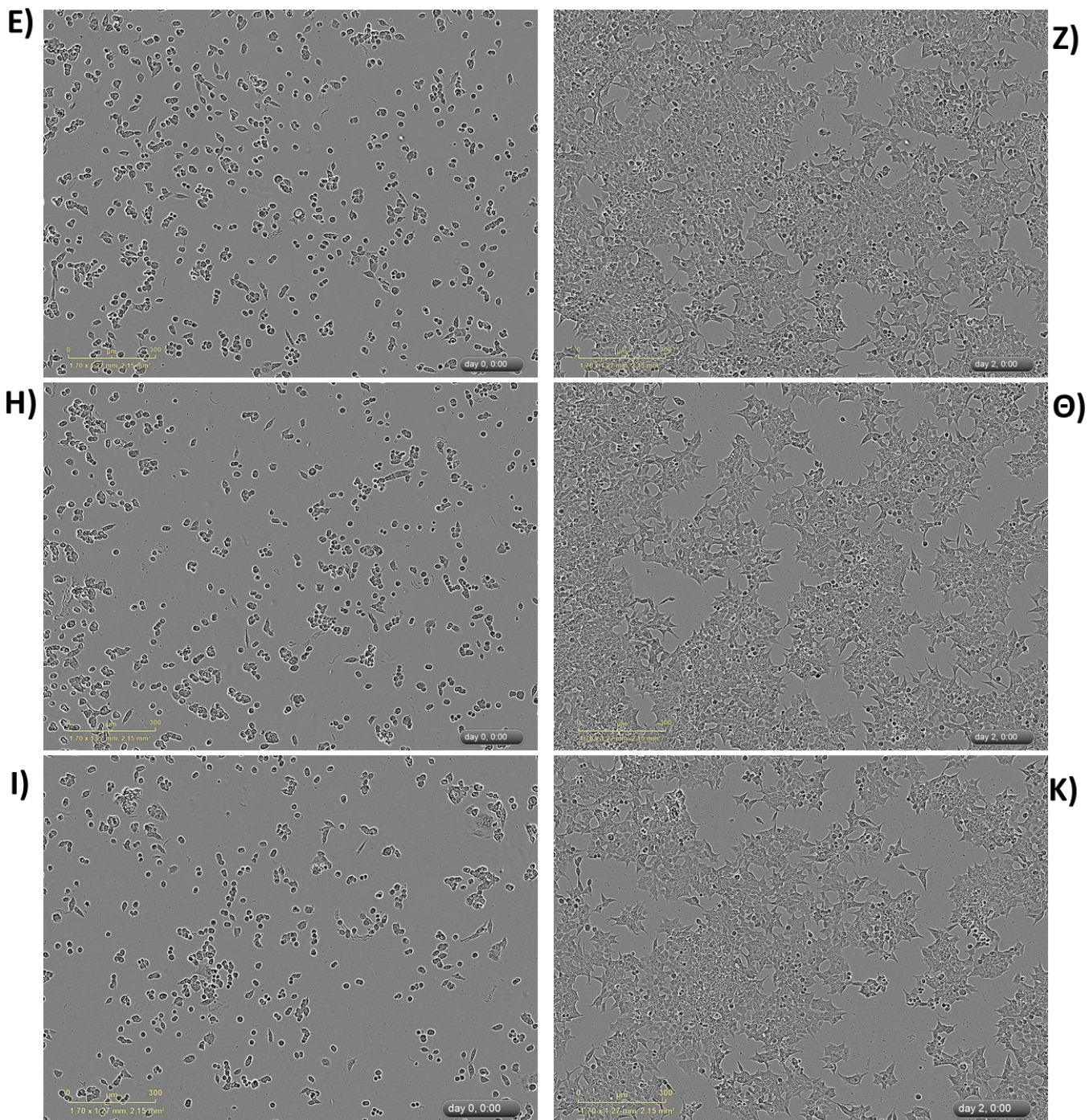


Γ)

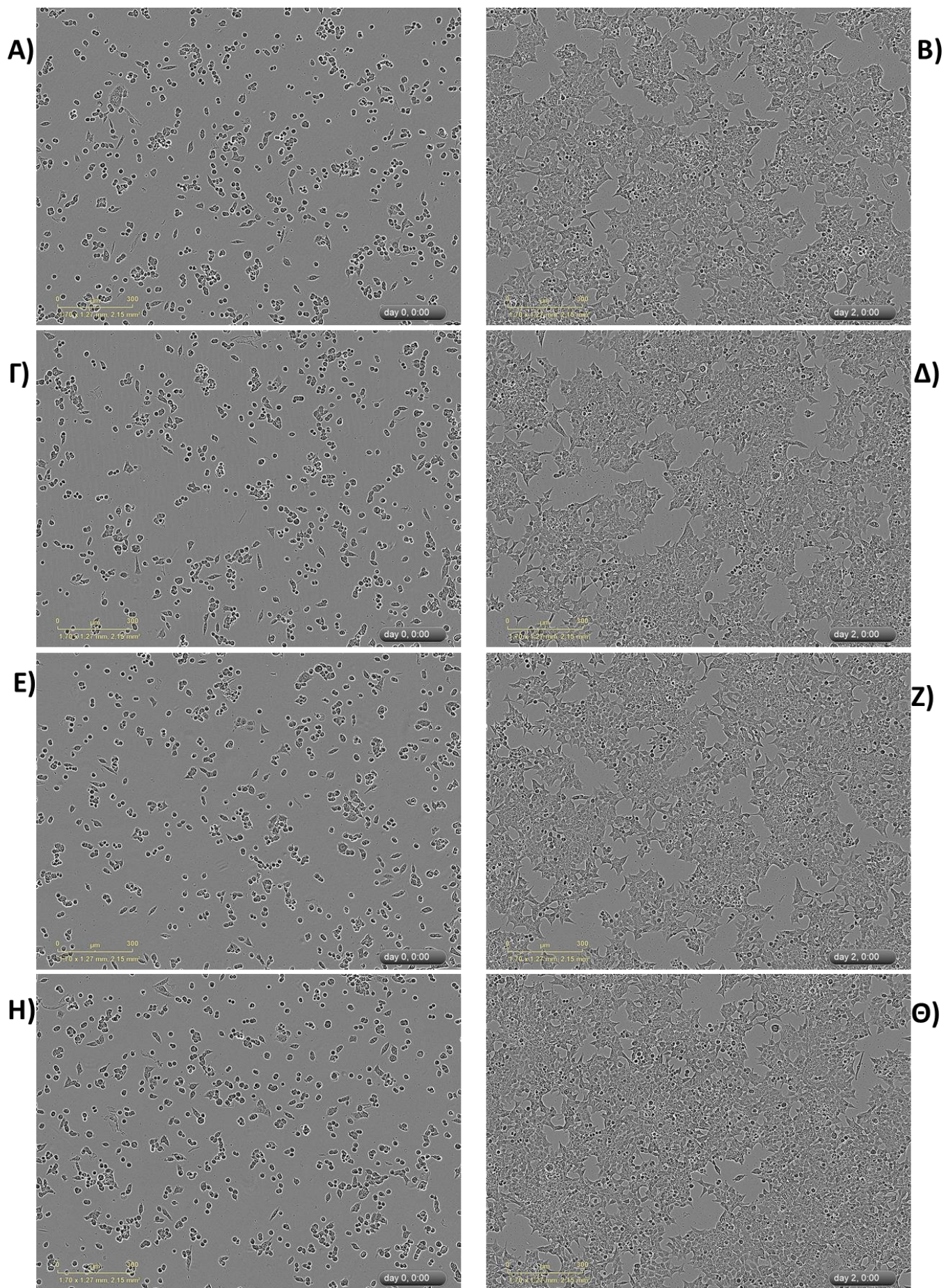


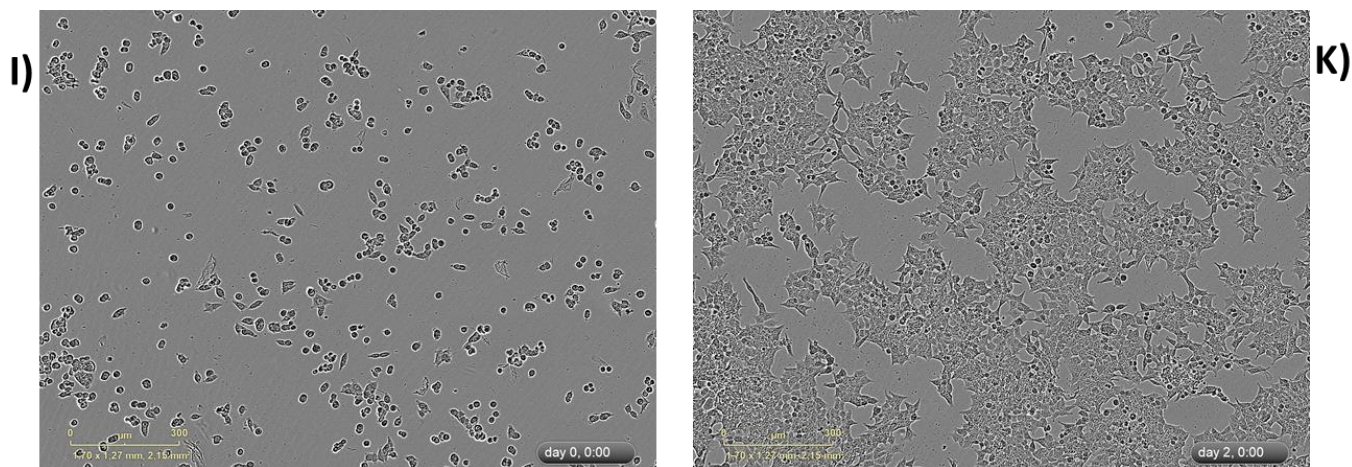
Δ)





Εικόνα 4.5: Απεικόνιση HCT-116 κυττάρων με προσθήκη IDTDTPD-Ph NPs συγκέντρωσης **A)** 0,25μg/ml στις 0h, **B)** 0,25μg/ml στις 48h, **Γ)** 0,125μg/ml στις 0h, **Δ)** 0,125μg/ml στις 48h, **E)** 0,0625μg/ml στις 0h, **Z)** 0,0625μg/ml στις 48h, **H)** 0,0325μg/ml στις 0h, **Θ)** 0,0325μg/ml στις 48h, **I)** 0,0156μg/ml στις 0h, **K)** 0,0156μg/ml στις 48h

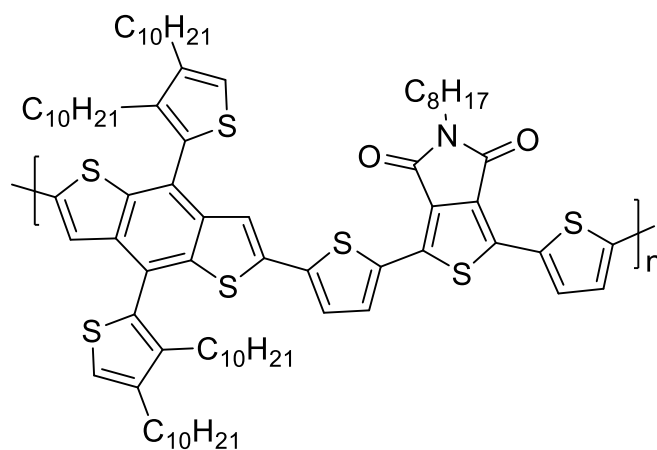




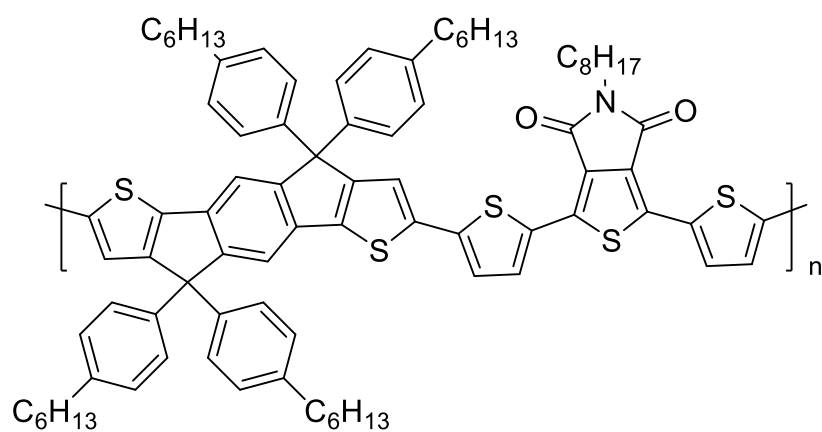
Εικόνα 4.6: Απεικόνιση HCT-116 κυττάρων με προσθήκη IDTDTPD-Th NPs συγκέντρωσης **A)** 0,25μg/ml στις 0h, **B)** 0,25μg/ml στις 48h, **Γ)** 0,125μg/ml στις 0h, **Δ)** 0,125μg/ml στις 48h, **Ε)** 0,0625μg/ml στις 0h, **Ζ)** 0,0625μg/ml στις 48h, **Η)** 0,0325μg/ml στις 0h, **Θ)** 0,0325μg/ml στις 48h, **Ι)** 0,0156μg/ml στις 0h, **Κ)** 0,0156μg/ml στις 48h

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΩΝ

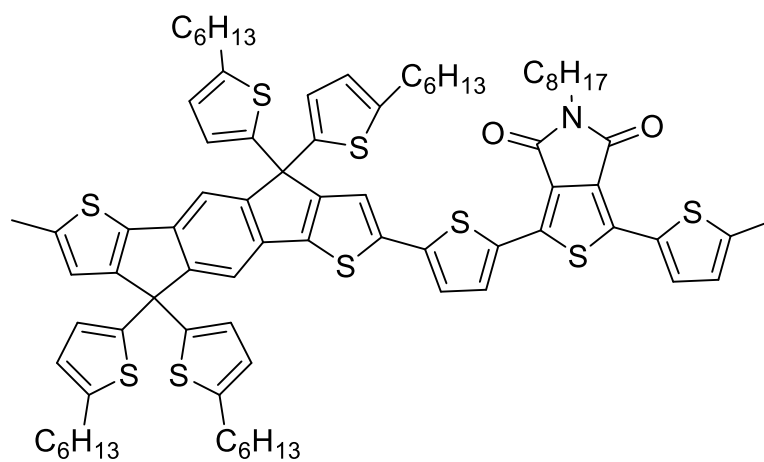
CPs	Conjugated Polymers, Συζυγιακά Πολυμερή
NPs	Nanoparticles, Νανοσωματίδια
CPNs ή CPNPs ή CNPs	Conjugated Polymer Nanoparticles, Νανοσωματίδια Συζυγιακών Πολυμερών
QY	Quantum Yield, Κβαντική Απόδοση
TME	Tumor Micro Environment, Μικροπεριβάλλον Καρκίνου
EPR	Enhanced Permeability and Retention, Ενισχυμένη Διαπερατότητα και Κατακράτηση
PAI	Photoacoustic Imaging, Φωτοακουστική Απεικόνιση
PDT	Photodynamic Therapy, Φωτοδυναμική Θεραπεία
PTT	Photothermal Therapy, Φωτοθερμική Θεραπεία



BTTPD-Th/CP1



IDTDTPD-Ph/CP2



IDTDTPD-Th/CP3