



**Polimery gwiaździste jako modelowe nanotransportery
leków i kwasów nukleinowych: synteza, struktura i
dynamika kationowych polimerów gwiaździstych na
bazie poli(glikolu etylenowego)**

Katarzyna Szcześniak

Wydział Fizyki

Centrum NanoBioMedyczne

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

promotor: prof. dr hab. Stefan Jurga

kopromotor: prof. dr hab. Krzysztof Matyjaszewski

Pragnę podziękować wszystkim, bez których niniejsza praca nie mogłaby powstać.

*Przede wszystkim mojemu promotorowi **Profesorowi Stefanowi Jurdze**, za umożliwienie mi napisania tej pracy, za opiekę, za możliwość rozwoju, za zachętę do zgłębiania tematu oraz wszelką pomoc jakiej mi udzielił w czasie mojego doktoratu.*

*Składam serdeczne podziękowania Panu **Profesorowi Krzysztofowi Matyjaszewskiemu** za możliwość spędzenia ponad roku w Jego grupie badawczej, za wszelką pomoc, dyskusje merytoryczne, wsparcie naukowe oraz cenne wskazówki i okazaną pomoc.*

*Pragnę podziękować Pani **Doktor Monice Makrockiej-Rydyk**, za całą przekazaną mi przez te lata wiedzę oraz wszelką pomoc, za niezliczone godziny konsultacji i dyskusji, setki poprawionych stron kolejnych wersji tej pracy, zawsze miłe słowo, wsparcie nie tylko merytoryczne, ale również psychiczne.*

*Pragnę również podziękować **Hongowi Cho** za wprowadzenie mnie w świat polimerów gwiazdzistych i całej **Grupie Bio** za pomoc w syntezach i miłą atmosferę w trakcie stażu.*

*Dziękuję Pani **Doktor Barbarze Peplińskiej**, za godziny spędzone ze mną przy mikroskopach, Panu **Doktorowi Markowi Kempce** za budujące dyskusje i pomiary dyfuzyjne, za pomoc w pomiarach DSC składam podziękowania Panu **Doktorowi Marcinowi Jarkowi**, za pomiary widm NMR Panu **Doktorowi Łukaszowi Popendzie**, za pomiary dyfuzji Panu **Doktorowi Kosmie Szutkowskiemu** oraz wszystkim, którzy pomogli mi w pomiarach i włączyli się w dyskusje merytoryczne, a których nie wymieniłam z imienia i nazwiska.*

*Dziękuję także **koleżankom i kolegom** z Zakładu Fizyki Makromolekularnej i Centrum NanoBioMedycznego za stworzenie wspaniałej atmosfery naukowej (i nie tylko).*

*Mojemu kochanemu **Mężowi** dziękuję za wsparcie.*

*Szczególne podziękowania składam moim **Rodzicom**. Bez Was nie byłabym w tym miejscu, w którym jestem teraz. Dziękuję!*

Moim Najbliższym...

Niniejsza praca oraz prezentowane w niej badania zostały wykonane przy wsparciu finansowym

Fundacji na rzecz Nauki Polskiej, Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka (PO IG) na lata 2007-2013 w ramach Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego

w ramach projektu MPD "The PhD Program in Nanoscience and Nanotechnology"

Spis treści

STRESZCZENIE.....	7
ABSTRACT	10
CELE PRACY	12
WSTĘP	13
1 POLIMERYZACJA RODNIKOWA Z PRZENIESIENIEM ATOMU (ATRP).....	17
1.1 ZALETY STOSOWANIA METODY ATRP	17
1.2 ZASADA DZIAŁANIA ATRP	18
2 KWASY NUKLEINOWE I ICH SPOSOBY DOSTARCZANIA/TERAPIA GENOWA.....	20
2.1 PODSTAWY TERAPII GENOWEJ I JEJ ZASADY DZIAŁANIA.....	20
2.2 RÓŻNE RODZAJE WEKTORÓW	21
2.2.1 Wektory wirusowe	21
2.2.2 Wektory niewirusowe	23
3 POLIMERY DO ZASTOSOWAŃ BIOLOGICZNYCH	26
3.1 KRYSTALICZNOŚĆ POLIMERÓW.....	27
3.2 POLIMERY GWIAZDZISTE	28
3.2.1 Budowa polimerów gwiazdzistych.....	28
3.2.2 Podstawowe sposoby syntezy polimerów gwiazdzistych	29
3.2.3 Zastosowanie polimerów gwiazdzistych w biologii i medycynie.....	31
3.3 POLIMERY KATIONOWE.....	32
3.4 POLIMERY BIODEGRADOWALNE.....	33
3.5 CHARAKTERYSTYKA NAJWAŻNIEJSZYCH WŁAŚCIWOŚCI POLIPEKSÓW	34
4 PRZEGLĄD METOD EKSPERYMENTALNYCH	36
4.1 MAGNETYCZNY REZONANS JĄDROWY	36
4.1.1 Spektroskopia wysokiej rozdzielczości	36
4.1.2 Metoda DOSY.....	37
4.2 RÓŻNICOWA KALORYMETRIA SKANINGOWA.....	40
4.2.1 Metoda kompensacji mocy	40
4.2.2 Zastosowanie metody DSC.....	41
4.3 TECHNIKI MIKROSKOPOWE	43
4.3.1 Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM).....	43
4.3.2 Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM)	46
4.3.3 Polaryzacyjna Mikroskopia Optyczna (POM)	48
4.4 DYNAMICZNE ROZPRASZANIE ŚWIATŁA I POTENCJAŁ ZETA	51
4.5 CHROMATOGRAFIA ŻELOWA I GAZOWA	52
4.6 BADANIA BIOLOGICZNE	54

Spis treści

4.6.1	Cytotoksyczność	54
4.6.2	Transfekcja.....	55
5	CHARAKTERYSTYKA BADANYCH MATERIAŁÓW	58
5.1	STOSOWANE ZWIĄZKI CHEMICZNE.....	58
5.2	APARATURA POMIAROWA I PRZYGOTOWANIE PRÓBEK DO POMIARÓW	58
6	PREZENTACJA WYNIKÓW	69
6.1	SYNTEZA BIOKOMPATYBILNYCH POLIMERÓW GWIAZDZISTYCH NA BAZIE POLI(GLIKOLU ETYLENOWEGO) Z KATIONOWYM I DEGRADOWALNYM RDZENIEM.....	69
6.1.1	Synteza crosslinkera.....	69
6.1.2	Synteza gwiazd polimerowych.....	70
6.2	BADANIA STRUKTURY I DYNAMIKI POLIMERÓW GWIAZDZISTYCH	74
6.2.1	Magnetyczny Rezonans Jądrowy (NMR).....	74
6.2.2	Dyfuzja (Magnetyczny rezonans jądrowy)	76
6.2.3	Dynamiczne rozpraszanie światła (DLS)	78
6.2.4	Skaningowa kalorymetria różnicowa (DSC)	82
6.2.5	Techniki mikroskopowe w badaniach polimerów gwiazdzistych.....	85
6.3	BADANIA BIOLOGICZNE POLIMERÓW GWIAZDZISTYCH	93
6.3.1	Cytotoksyczność	93
6.3.2	Transfekcja.....	94
7	DYSKUSJA WYNIKÓW	96
7.1	SYNTEZA I STRUKTURA POLIMERÓW GWIAZDZISTYCH.....	97
7.2	KRYSTALICZNOŚĆ POLIMERÓW.....	99
7.3	DYFUZJA.....	102
7.4	KATIONOWOŚĆ	104
7.5	BIODEGRADOWALNOŚĆ	104
7.6	CYTOTOKSYCZNOŚĆ	106
7.7	KOMPLEKSACJA POLIMERÓW GWIAZDZISTYCH I WYDAJNOŚĆ TRANSFEKCJI.....	106
8	WNIOSKI KOŃCOWE	108
	LITERATURA.....	110
	DODATEK A.	117
	SPIS ILUSTRACJI.....	118
	OŚWIADCZENIE	121

Streszczenie

W dobie szkodliwego wpływu środowiska zewnętrznego na nasze organizmy odnotowuje się rosnącą liczbę chorób genetycznych wynikających z niezdrowego trybu i środowiska życia. Rozwiązania problemów współczesnego świata w tej materii upatruje się w terapii genowej. Takie podejście terapeutyczne ma na celu korekcję wady genetycznej (stanowiącej podłoże choroby) poprzez dostarczenie kwasu nukleinowego (NA) powodującego przywrócenie ekspresji prawidłowego (DNA) lub wyciszenie zdefektowanego genu (siRNA). W celu umożliwienia kwasowi nukleinowemu dostanie się do wnętrza komórki niezbędne jest użycie układu transportującego (wektora, nośnika) dla efektywnego transportu i uwalniania dostarczonej zawartości.

Obecnie wytwarzanych jest wiele różnego typu polimerów, jednakże w tej bogatej gamie materiałów polimerowych brakuje polimerów posiadających specyficzne właściwości niezbędne dla dostarczania kwasów nukleinowych. W wielu przypadkach potrzebne są materiały o właściwościach fizycznych i chemicznych odmiennych od tych, które wykazują wektory dostępne na rynku. W zawiązku z wymaganiami stawianymi przed polimerowymi systemami dostarczania NA w niniejszej pracy postanowiono skupić się na takich polimerach gwiazdzystych, które posiadają wszystkie właściwości dobrego wektora polimerowego. To właśnie stało się inspiracją do zaprojektowania, syntezy i badań kationowych, degradowalnych polimerów gwiazdzystych na bazie poli(glikolu etylenowego).

Celem przeprowadzonych prac badawczych było określenie właściwości zsyntetyzowanych polimerów gwiazdzystych, pod kątem wykorzystania ich jako modelowych układów do dostarczania leków i kwasów nukleinowych. Dzięki zastosowaniu metody ATRP, która umożliwia kontrolowaną syntezę funkcjonalnych polimerów, zsyntetyzowano polimery gwiazdziste na bazie kationowego monomeru jakim jest metakrylan 2-dimetyloamino etylu (DMAEMA). Wybór monomeru DMAEMA miał na celu wytworzenie takich polimerów, które posiadają zdolność kompleksowania NA (enkapsulacji). Z kolei wbudowanie w rdzeń dwusiarczku bis (2-metakryloilo) oksyetylu (DSDMA) zapewnia obecność mostków dwusiarczkowych, które umożliwiają rozpad molekuly, co jest gwarantem możliwości degradacji tych układów zaplanowanej po dostarczeniu NA. Wprowadzenie politlenku etylenu (PEG) jako ramion molekuly o strukturze gwiazdzistej miało na celu zwiększanie biokompatybilności układu polimerowego, zapewnienie jego nietoksyczności i ochrony materiału genetycznego przed

uszkodzeniem. Uzyskano cztery polimery kationowe różniące się między sobą zawartością kationowego składnika w rdzeniu.

Wyniki badań przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy dowiodły, że zastosowanie metody ATRP umożliwia syntezę polimerów gwiazdzistych o ściśle zaprojektowanej architekturze, które charakteryzują się wysoką masą cząsteczkową i niską polidispersyjnością. Analiza wyników przeprowadzonych badań wykazała, że w procesie syntezy otrzymano polimery o architekturze gwiazdy z wbudowanymi wewnątrz rdzenia mostkami dwusiarczkowymi i kationowym składnikiem oraz biokompatybilnymi ramionami PEG. Procesy dyfuzji polimerów gwiazdzistych oraz rozmiary gwiazd polimerowych w roztworach wodnych scharakteryzowano z użyciem metody magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) poprzez wyznaczenie współczynników dyfuzji gwiazd polimerowych oraz obliczenie ich promieni hydrodynamicznych. Rozmiary gwiazd polimerowych, wyznaczone na podstawie analizy wyników badań NMR, są zgodne z tymi, które oszacowano z użyciem metody dynamicznego rozpraszania światła (DLS). Zmierzone wartości współczynników dyfuzji gwiazd polimerowych są porównywalne do wartości współczynników dyfuzji biopolimerów aktywnych, co gwarantuje wystarczającą ruchliwość nośników.

Parametry przemian termodynamicznych dla syntezowanych polimerów tj. temperaturę topnienia i krystalizacji jak również ich stopień krystaliczności wyznaczono przy zastosowaniu metody różnicowej kalorymetrii skaningowej. Stwierdzono, że wraz ze wzrostem udziału kationowego składnika w rdzeniu gwiazdy zmniejszeniu ulegają wartości temperatur krystalizacji i topnienia. Stabilność zsyntetyzowanych polimerów w obserwowanym zakresie temperatur umożliwia ich zastosowanie w organizmach żywych. Badania mikroskopowe (TEM, SEM) wykazały, że wskutek odparowania rozpuszczalnika zachodzą procesy agregacji gwiazd polimerowych. Obserwacje te mogą mieć istotne znaczenie w późniejszym zastosowaniu polimerów do przygotowania na ich bazie gotowych nośników leków lub kwasów nukleinowych.

Stwierdzono, że potencjał zeta uzyskanych polimerów o strukturze gwiazdy wzrasta wraz z udziałem kationowego składnika w mieszaninie reakcyjnej. Względnie wysoka dodatnia wartość tego potencjału jest warunkiem koniecznym, aby układy polimerowe mogły być zastosowane do kompleksowania i przenoszenia kwasów nukleinowych. Wśród zsyntezowanych polimerów wytypowano układy cechujące się dodatnią wartością tego potencjału, które mogą znaleźć potencjalne zastosowanie. Analiza badań biologicznych

tych układów polimerowych miała na celu określenie ich cytotoksyczności i wydajności transfekcji NA.

Testy cytotoksyczności tych układów wykazały, że cechuje je wysoka biokompatybilność. Natomiast badania transfekcji roztworów polimerów gwiaździstych z kwasem nukleinowym (przy niskich stężeniach kwasu) wykazały, że badane polimery tworzą kompleksy, wystarczająco stabilne, aby dostarczyć DNA do komórek i wywołać ekspresję genu reporterowego. Przeprowadzone badania degradacji tych polimerów świadczą o tym, że podlegają one rozpadowi do rozmiarów zapewniających możliwość ich wydalenia z organizmu przez klirens nerkowy.

Reasumując można stwierdzić, że przeprowadzona synteza z zastosowaniem metody ATRP pozwoliła uzyskać kationowe, biodegradowalne polimery gwiaździste, których właściwości fizykochemiczne zostały zbadane kompleksowo. Przeprowadzone badania umożliwiły wytypowanie polimerów gwiaździstych będących najbardziej obiecującymi kandydatami do zastosowania w terapii genowej, jako niewirusowe wektory do transportu kwasów nukleinowych.

Abstract

Nowadays, with the development of nanotechnology, more and more world-class research laboratories are engaged in the design and synthesis of more sophisticated nanomaterials. Due to the harmful effects of our lifestyle and from the external environment on our bodies, many genetic diseases have appeared in recently. Therefore, it has become extremely important to discover and to synthesize new materials that could prevent these diseases, as well as to study the effects of such nanoparticles on compounds of natural origin – biomolecules. The method where nanoparticles are used as modern vectors for transfection is known as gene therapy. This therapy, based on the delivery of nucleic acids for the treatment of various genetic disorders, is nowadays an object of interest for many scientists from miscellaneous disciplines. Different kinds of nucleic acids (NA), such as plasmid DNA and short interfering RNA, can be used to either express or silence proteins or enzymes in the cell. Therefore, it may also play an important role in the therapeutic treatment of many diseases, including cancer. Recent studies have focused on finding carriers that prevent electrostatic repulsion between the cell membrane and NAs and lead to an increase in NA permeability in the cell. The development of controlled radical polymerization made it possible to prepare a wide variety of complex macromolecular architectures with well-defined molecular weight, and structural and compositional homogeneity. Atom transfer radical polymerization (ATRP) is one of the most robust controlled radical polymerization (CRP) techniques. It can be used to produce polymers of various compositions and architectures (e.g. star polymers, block copolymers etc.), enabling the introduction of innovative features to the polymer.

The aim of this research is first to obtain and then characterize new, efficient, biocompatible, and degradable polymeric carriers for NA delivery and afterwards determine the possibility of using them as vehicles for nucleic acids (and drug) delivery systems. Promising candidates in this field are star polymers with multiple arms joined to a centrally located core, having a three-dimensional spherical compact structure and functions either on the periphery or in the core. The study involves the polymerization (by an “arm-first” ATRP method) of poly (ethylene glycol) (PEG)-based star polymers with cationic moieties [2-(dimethylamino)ethyl methacrylate (DMAEMA)] and degradable core.

The tested group of compounds consist of four cationic polymers, with various content of the cationic component in the core. Their structural characteristics were characterized by differential scanning calorimetry (DSC), nuclear magnetic resonance (NMR), NMR diffusion, dynamic light scattering (DLS), microscopic techniques such as scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM), and polarizing optical microscopy (POM) as well as biological tests (to determine cytotoxicity and transfection efficiency). The results show that the synthesis of polymers by the ATRP method allows synthesis star shaped polymers with a high molecular weight, low polydispersity and well-designed architecture. Studies have shown that the structure of the synthesized polymers is a star-like architecture with cross-linked core containing disulfide bonds and the cationic component and the core is surrounded by biocompatible PEG arms. With increasing the proportion of the cationic component in the reaction mixture it is possible to obtain star polymers with positive zeta potential values, which allow complexation and transfer of negatively charged nucleic acids. Experiments carried out by DSC allowed the determination of the thermodynamic parameters of the synthesized polymers, i.e. melting and crystallization temperatures as well as their degree of crystallinity. Increasing the cationic component in the core of the star polymer reduces the crystallization temperature and melting point. The range of observed temperature confirms the use of the polymers in the future in living organisms. The studies of polymer degradation have shown that they are subject to decay to the size of ensuring the possibility of their removal from the body by renal clearance. Microscopic studies led to the observation of the aggregation processes that occur after evaporation of the solvent. This may have a significant role in the later application in the preparation of new media used to deliver drugs or nucleic acids, based on star-shaped polymers. DLS and NMR measurements were used to determine the sizes of star polymers in solution, and the behavior of the polymers in the solution was characterized by determining the diffusion coefficients. The study of the complexes made from the star polymers with the nucleic acids (a low concentration of acid) showed that the tested polymers form complexes sufficiently stable to deliver DNA into cells, and cause expression of the reporter gene. Tested polymers also exhibit low cytotoxicity.

Thanks to extensive research, the cationic, biodegradable star-shaped polymers were obtained and their physical and chemical properties were investigated. Combined results of carried out measurements have allowed us to select the most suitable and promising candidates as nonviral vectors for gene therapy.

Cele pracy

Głównym celem pracy było zaprojektowanie, synteza oraz charakterystyka nowych polimerów gwiazdzistych na bazie poli(glikolu etylenowego) (PEG) z biodegradowalnym i kationowym rdzeniem, a następnie określenie możliwości ich wykorzystania jako nośników do terapii genowej. Struktura i dynamika molekularna polimerów gwiazdzistych PEG, zróżnicowanych ze względu na zawartość kationowego składnika w rdzeniu, zostały scharakteryzowane z wykorzystaniem następujących metod pomiarowych: magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC), technik mikroskopowych (POM, TEM, SEM), dynamicznego rozpraszania światła (DLS), chromatografii żelowej i gazowej (GPC SEC i GC) oraz testów cytotoksyczności i wydajności transfekcji.

Szczegółowe cele badawcze sformułowane zostały następująco:

- zaprojektowanie i synteza metodą ATRP kationowych, biodegradowalnych i biokompatybilnych polimerów gwiazdzistych,
- określenie struktury otrzymanych układów polimerowych,
- wyznaczenie współczynników dyfuzji polimerów gwiazdzistych w roztworach wodnych,
- wyznaczenie parametrów termodynamicznych przejść fazowych gwiazd polimerowych,
- określenie wpływu zawartości kationowego składnika w polimerze na zdolność do krystalizacji badanych układów,
- określenie stopnia cytotoksyczności zsyntetyzowanych polimerów gwiazdzistych,
- określenie zdolności otrzymanych gwiazd polimerowych do dostarczania kwasów nukleinowych poprzez zbadanie wydajności procesu transfekcji,
- zbadanie procesu degradacji badanych polimerów w warunkach fizjologicznych.

Wstęp

W dzisiejszych czasach wraz z rozwojem nanotechnologii obserwuje się wzrost liczby światowej klasy laboratoriów zaangażowanych w projektowanie i syntezę coraz bardziej wyrafinowanych rodzajów nanomateriałów. Ze względu na szkodliwe działanie środowiska zewnętrznego na nasze organizmy pojawia się wiele nowych chorób wynikających z trybu życia współczesnego człowieka. W związku z powyższym bardzo ważnym staje się odkrywanie i synteza nowych materiałów, które będą mogły znaleźć zastosowanie w medycynie, w szczególności jako środki stosowane w leczeniu współczesnych chorób cywilizacyjnych, a także jako farmaceutyki wspomagające istniejące już metody terapeutyczne. Ważne wydaje się również prowadzenie badań nad wpływem nowego typu nanocząsteczek na związki naturalnego pochodzenia i biomolekuły. Burzliwy rozwój cywilizacji i związane z tym sukcesywne wprowadzanie do organizmu ludzkiego wielu związków chemicznych, w produktach żywnościowych czy też w farmaceutykach, zmusza badaczy do poszukiwania selektywnych i skutecznych metod ich oznaczania.

Dynamicznie rozwijającą się i coraz szerzej stosowaną metodą leczenia chorób genetycznych (np. kostnienia heterotropowego – samoistnej zamiany tkanki miękkiej w kostną), neurodegeneracyjnych (np. Alzheimer) jest terapia genowa. Najważniejszym czynnikiem, wpływającym na przeprowadzenie skutecznego leczenia tą metodą, jest stosowany w niej układ, służący do dostarczania kwasu nukleinowego (NA) do komórek, nazywany wektorem. Dzięki niemu transport materiału genetycznego do komórek może zostać przeprowadzony w sposób wydajny i zapewniający ochronę tego materiału przed uszkodzeniami. Współczesne systemy dostarczania genów można podzielić na biologiczne (wirusowe) i niebiologiczne (niewirusowe). Do tej drugiej grupy zaliczane są np. dendrymery czy polimery kationowe, które to wchodzi w interakcje z NA poprzez oddziaływanie elektrostatyczne. Przykładem nowych, wielofunkcyjnych nanomateriałów, które w swej geometrii przypominają dendrymery, lecz są od nich tańsze i łatwiejsze w produkcji, są polimery gwiazdziste. Składają się one z funkcjonalnego rdzenia i radialnie rozchodzących się od niego ramion.

Główne wyzwania stojące przed naukowcami tworzącymi polimerowe nośniki leków i kwasów nukleinowych to między innymi precyzyjna synteza chemiczna i późniejsza analiza właściwości wytworzonych polimerów. W dalszych etapach niezbędne jest kontrolowanie supramolekularnego połączenia nośników polimerowych z kwasami

nukleinowymi w jednolite nanocząsteczki, pogłębianie zrozumienia mechanizmów i alternatywnych ścieżek potrzebnych do dalszej optymalizacji zewnątrzkomórkowego oraz wewnątrzkomórkowego, a także ukierunkowanego dostarczania leczniczych kwasów nukleinowych [1].

W ostatnich latach nastąpił gwałtowny rozwój metod otrzymywania polimerów, wśród których jedną z najciekawszych i godnych uwagi jest metoda polimeryzacji rodnikowej z przeniesieniem atomu (ATRP). Jest ona jedną z najbardziej skutecznych i najczęściej stosowanych metod kontrolowanej polimeryzacji rodnikowej (CRP). Ten sposób polimeryzacji miał swoje początki w 1995 roku, kiedy to profesor Krzysztof Matyjaszewski z Uniwersytetu Carnegie Mellon, odkrył jedną z pierwszych i najbardziej wydajnych metod kontrolowanej polimeryzacji rodnikowej. Nie spodziewano się wówczas, że metoda ta osiągnie powszechne zastosowanie w tak szybkim tempie i będzie niezwykle użyteczna w wielu dziedzinach nauki oraz techniki [2]. Stosując ją można tworzyć polimery poprzez łączenie elementów składowych, zwanych monomerami, w sposób ściśle kontrolowany, kawałek po kawałku. Taki sposób syntezy polimerów umożliwił stworzenie szerokiej gamy materiałów charakteryzujących się unikatowymi właściwościami, ukierunkowanych i dostosowanych do specyficznych zastosowań. Wcześniej niemożliwe było otrzymywanie tak precyzyjnie wytworzonych układów polimerowych, które charakteryzują się powtarzalnością struktury molekuł i małym rozrzutem mas cząsteczkowych. Obecnie metoda ATRP znalazła wiele aplikacji m.in. do syntezy polimerów stosowanych jako powłoki i kleje, jako środki powierzchniowo czynne, a w szczególności takich, które mają zastosowanie w dziedzinie medycyny i ochrony środowiska.

Głównym celem tej pracy była synteza polimerów gwiazdzistych o ściśle zaprojektowanej strukturze, wytworzonych na bazie biokompatybilnego poli(glikolu etylenowego) i zawierających kationowy, biodegradowalny rdzeń. W następnym etapie niniejszej pracy zaplanowano sporządzenie charakterystyki strukturalnej otrzymanych polimerów, cechujących się różnym udziałem kationowego składnika. Metodę magnetycznego rezonansu jądrowego zastosowano aby sprawdzić zgodność budowy cząsteczkowej otrzymanych polimerów z zaprojektowaną strukturą. Pomiar współczynników dyfuzji z zastosowaniem magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) i metody dynamicznego rozpraszania światła (DLS) wykonano w celu określenia rozmiarów molekuł polimerów gwiazdzistych. Z kolei metody chromatografii żelowej i gazowej były dedykowane określeniu średniej ilości ramion wbudowanych w pojedynczą

cząsteczkę. Dynamiczną kalorymetrię różnicową zastosowano z zamiarem wyznaczenia parametrów przemian termodynamicznych oraz stopnia krystaliczności badanych polimerów. Z kolei metodę polaryzacyjnej mikroskopii optycznej przewidziano dla obserwacji procesów tworzenia sferolitów w analizowanych układach polimerowych. W celu określenia struktury i rozmiarów nanocząsteczek, jak również zachowania polimerów po odparowaniu rozpuszczalnika, posłużono się metodami mikroskopowymi. Metoda DLS posłużyła również do zbadania degradacji zsyntetyzowanych gwiazd w środowisku odzwierciedlającym to panujące w komórkach żywych. W celu określenia możliwości wykorzystania tych układów jako nośników w terapii genowej, sprawdzono zdolność otrzymanych polimerów gwiaździstych do wiązania cząsteczek DNA za pomocą testu wydajności transfekcji. Wyżej wymienione badania przeprowadzone zostały częściowo w trakcie rocznego stażu na Uniwersytecie Carnegie Mellon w Pittsburgu (USA).

Pracę podzielono na dwie części: teoretyczną i doświadczalną. Część teoretyczna, zawierająca cztery rozdziały, rozpoczyna się od przedstawienia w szczególach metody syntezy wykorzystanej do wytworzenia badanych polimerów. W rozdziale drugim zawarto podstawowe wiadomości dotyczące terapii genowej wraz z opisem najważniejszych nośników kwasów nukleinowych, które są obecnie używane lub potencjalnie mogą znaleźć zastosowanie w przyszłości. Trzeci rozdział jest poświęcony polimerom dedykowanym do zastosowań biologicznych i ich charakterystyce. W rozdziale czwartym opisano podstawy metod pomiarowych stosowanych w niniejszej pracy do scharakteryzowania badanych układów polimerowych.

Część doświadczalną rozpoczyna rozdział piąty, w którym zawarty został opis preparatyki próbek oraz stosowanych technik eksperymentalnych. Następny fragment pracy, na który składa się rozdział szósty i siódmy, obejmuje wyniki pomiarów wraz z dyskusją. Prezentację wyników przeprowadzono w następujący sposób: najpierw omówiono syntezę jednego z monomerów, stosowanego do syntezy gwiazd polimerowych, a następnie samą syntezę gwiazd. W dalszych rozdziałach przedstawiono wyniki badań polimerów gwiaździstych z zastosowaniem poszczególnych metod, w kolejności niezbędnej dla uzyskania pełnej charakterystyki badanych układów. Po rozdziale poświęconym syntezie następuje rozdział zawierający opis wyników badań protonowych widm NMR, a kolejny zawiera informacje o rozmiarach zsyntetyzowanych nanomolekuł, które określono na podstawie analizy procesów dyfuzji molekuł badanych metodami magnetycznego rezonansu jądrowego i metody dynamicznego rozpraszania światła.

W następnych rozdziałach podano parametry przemian termodynamicznych wyznaczone dla badanych układów metodami kalorymetrycznymi, oraz badania strukturalne polimerów z zastosowaniem mikroskopii polaryzacyjnej (POM) i elektronowej (SEM i TEM). Ostatnią część prezentacji wyników poświęcono badaniom cytotoksyczności i wydajności transfekcji gwiazd polimerowych.

Przedostatni rozdział stanowi dyskusja wyników, w której zawarto omówienie wyników przeprowadzonych badań, w odniesieniu do właściwości zsyntezowanych polimerów. Ostatni, ósmy rozdział zawiera główne wnioski płynące z przeprowadzonych badań i analiz.

Otrzymane wyniki pozwoliły scharakteryzować polimery gwiaździste będące obiecującymi kandydatami do zastosowań w terapii genowej jako niewirusowe wektory do transportu kwasów nukleinowych i jako układy, które mogą posłużyć również do dostarczania innych leków.

1 POLIMERYZACJA RODNIKOWA Z PRZENIESIENIEM ATOMU (ATRP)

Polimery są związkami chemicznymi złożonymi z dużej ilości zazwyczaj jednakowych elementów, nazywanych jednostkami monomerycznymi lub merami [3]. Podstawą do otrzymania związków polimerowych są monomery. Monomerem jest związek, którego cząsteczki wskutek reakcji polimeryzacji łączą się tworząc polimer [4]. Polimery cieszą się coraz większą popularnością i są stosowane w wielu dziedzinach życia, już nie tylko w przemyśle opakowaniowym, samochodowym czy ochronie środowiska, ale coraz częściej są także wykorzystywane w medycynie m.in. jako soczewki czy nośniki leków (wektory). Przy takim wykorzystaniu polimerów niezwykle istotna jest wiedza o ich architekturze, właściwościach jak i topologii, które determinują na przykład możliwość związania polimeru z odpowiednio przygotowanym materiałem genetycznym czy lekiem i wprowadzenia, po skoniugowaniu go z lekiem, do komórki. Proces przenoszenia leków jest bardzo skomplikowany, ma wiele etapów i jest ściśle uzależniony od zastosowanego nośnika.

W związku z powyższym bardzo ważnym zagadnieniem staje się syntezywanie polimerów o ściśle zaprojektowanej architekturze i właściwościach. Istnieje wiele metod otrzymywania polimerów. Do najbardziej popularnych metod należy kontrolowana „żyjąca” polimeryzacja rodnikowa (ang. controlled radical polymerization – CRP) [5], której szczególnym rodzajem jest polimeryzacja rodnikowa z przeniesieniem atomu (ang. ATRP – atom transfer radical polymerization) [6 – 7]. Metody te umożliwiają ścisłą kontrolę nad wymiarami (ciężarem cząsteczkowym) [8], jednorodnością (rozkład masy cząsteczkowej – polidispersyjność), topologią (geometrią), kompozycją i funkcjonalnością syntetyzowanego polimeru [9]. Zaletą metod CRP jest wysoka tolerancja na zanieczyszczenia (mogące pojawić się w układzie reakcyjnym) i możliwość włączenia wielu typów grup funkcyjnych do cząsteczek syntetyzowanych polimerów (np. grup hydroksy, aminowych, amidowych, estrowych, karboksylowych) [5], które następnie mogą zostać poddane modyfikacji, co pozwala na późniejsze kowalencyjne podłączenia biomolekuł oraz dostarczenie leków.

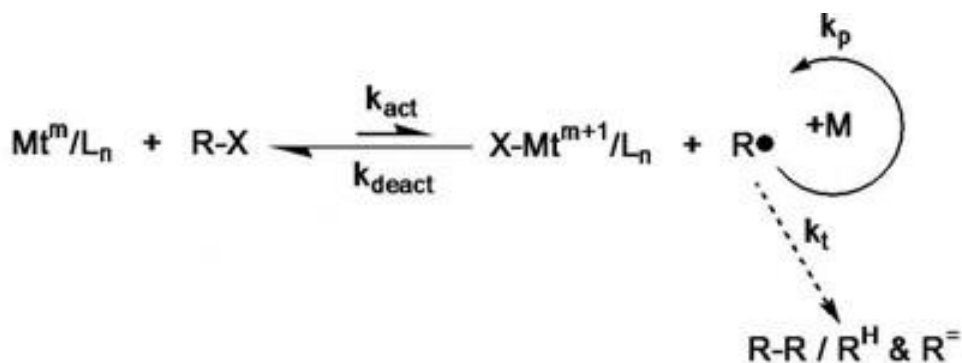
1.1 Zalety stosowania metody ATRP

ATRP jest metodą kontrolowanej polimeryzacji rodnikowej umożliwiającą wprowadzenie monomerów i związków sieciujących do łańcucha polimerowego

w kontrolowany, zaprogramowany sposób, co pozwala otrzymywać łańcuchy polimerowe o niemalże jednakowej długości określonej poprzez stosunek użytego monomeru względem zużycia dodanego inicjatora [10]. Metoda ta wprowadzona prawie 20 lat temu, szybko zyskała zastosowanie do wytwarzania funkcjonalnych materiałów polimerowych, które są użyteczne w wielu dziedzinach [5]. Ponadto, dużym atutem polimeryzacji metodą ATRP jest uzyskanie na jednym końcu łańcucha polimerowego atomu bromu lub chloru, co umożliwia tworzenie biokoniugatów tak wytworzonych syntetycznych polimerów i biocząsteczek [11 – 12]. Zastosowanie metody ATRP do syntetyzowania układów polimerowych oferuje możliwość dostosowania struktury tych układów do potrzeb precyzyjnego dostarczania leków i kwasów nukleinowych.

1.2 Zasada działania ATRP

Metoda ATRP jest oparta na reakcji redoks pomiędzy rozpuszczonym w roztworze jonem metalu przejściowego a halogenkiem alkilu w celu regulacji równowagi pomiędzy ich reaktywnymi i nieaktywnymi formami [13]. Wszystkie metody CRP bazują na dynamicznej równowadze pomiędzy propagującym rodnikiem i różnymi stanami uśpienia, z równowagą przesuniętą mocno w stronę stanu uśpienia. Charakterystyczne dla metod CRP jest szybkie inicjowanie, niska koncentracja wolnych rodników i bardzo sporadyczne występowanie reakcji terminacji. Stała szybkość wymiany (Rysunek 1) pomiędzy aktywnymi i „uśpionymi” łańcuchami musi być szybsza niż stała szybkości propagacji, aby zapewnić równoczesny wzrost wszystkich łańcuchów [10]. W układzie polimeryzacyjnym ATRP występują cztery zasadnicze reagenty: inicjator, aktywator, kompleks zdezaktywowany i makrorodniki, rosnące dzięki przyłączaniu kolejnych cząsteczek monomeru.



Rysunek 1 Równowaga pomiędzy aktywnym i uśpionym stanem w mechanizmie ATRP. R-X: halogenek alkilu; M^{n+} : jon metalu przejściowego; L_x : ligand [14]

Metalami centralnymi w kompleksach katalitycznych, stosowanymi w metodzie ATRP, są metale przejściowe takie jak Cu(I), Ni(II), Fe(II), które nie uczestniczą w procesie tworzenia innych związków metaloorganicznych [15]. Rolę ligandu pełnią różnego rodzaju związki, które są pochodnymi 2,2'-bipirydyny. Do najbardziej popularnych należą N,N,N',N'',N''-pentametylodietylenotriamina (PMDETA) czy 1,1,4,7,10,10-heksametylo trietylenotetramina. Podczas odwracalnego procesu redoks następuje przeniesienie jednego elektronu z kompleksu metalu przejściowego, znajdującego się na najniższym stopniu utlenienia, z towarzyszącym temu oderwaniem atomu fluorowca od łańcucha polimeru zakończonego tymże halogenkiem (forma uśpiona), co prowadzi do utworzenia rodnika i zdezaktywowanego kompleksu katalizatora na wyższym stopniu utlenienia. Łańcuch rośnie poprzez nieprzerwane, stopniowe dołączanie kolejnych monomerów. W początkowym etapie formą uśpioną jest inicjator, zakończony halogenkiem, który generuje równowagę pomiędzy stanami i po pierwszym kroku dodania monomeru, rosnący łańcuch polimerowy staje się formą uśpioną [6]. Dobór ligandu do reakcji jest bardzo ważny ze względu na to, że to właśnie on kreuje reaktywność kompleksu katalizatora w zależności od użytego monomeru, jak również wpływa na jego rozpuszczalność w środowisku reakcji [9]. W metodzie ATRP terminacja polimeryzacji następuje poprzez sprzęganie rodników lub dysproporcjonację. Jak już wspomniano, w metodzie ATRP stosowane są różnego rodzaju metale przejściowe, jednakże w najbardziej przystępnym i wydajnym wariantcie tej metody używane są kompleksy miedzi. Podobna sytuacja ma miejsce w przypadku ligandów, jednak dostępność i cena sprawiają, że w tym przypadku najbardziej popularnymi są ligandy z atomami azotu. Oprócz odpowiedniego doboru ligandu i metalu, sukces polimeryzacji ATRP zależy również od wielu innych parametrów wpływających na równowagę reakcji takich jak struktura inicjatora, typ rozpuszczalnika, temperatura reakcji, obecność jonów w stanie utlenionym oraz udział ligandu w stosunku do metalu przejściowego. Wszystkie powyższe parametry odgrywają istotną rolę w ogólnej wydajności polimeryzacji.

2 KWASY NUKLEINOWE I ICH SPOSOBY DOSTARCZANIA/TERAPIA GENOWA

2.1 Podstawy terapii genowej i jej zasady działania

Metoda lecznicza, która polega na włączeniu lub wyłączeniu funkcji danego genu w celach terapeutycznych, poprzez wprowadzenie do komórek kwasu nukleinowego, jest nazywana terapią genową. Pierwszy raz została ona zastosowana w 1990 r. u pacjenta, który cierpiał na dziedziczny zespół ciężkiego złożonego niedoboru odporności, powstały w wyniku mutacji w genie kodującym enzym o nazwie deaminaza adenozykowa [16]. Pacjenta tego poddano następującej procedurze: pobrano od niego białe krwinki, które następnie poddano modyfikacji *ex vivo* za pomocą retrowirusów w celu uzyskania prawidłowej ekspresji genu deaminazy adenozykowej, a następnie tak zmodyfikowane leukocyty wprowadzono do ciała pacjenta. Po wprowadzeniu zmodyfikowanych komórek pacjentowi zaobserwowano znaczący wzrost aktywności układu immunologicznego. Próba ta była istotna dla rozwoju terapii genowej. Należy jednak mieć świadomość, że pomimo początkowego sukcesu tego typu leczenia, może ono nieść pewne zagrożenia związane z powikłaniami, takimi jak np. wtórna białaczka, która może być skutkiem przypadkowej insercji genu do genomu. Pojawienie się nowych metod wymusza potrzebę badań w dziedzinie terapii genowej z naciskiem na metody transferu genów i materiałów użytych do ich przenoszenia.

Terapia genowa jest eksperymentalną metodą terapeutyczną, polegającą na wprowadzeniu odpowiednio przygotowanego materiału, w formie aktywnej biologicznie, do jądra komórkowego lub cytoplazmy komórek pacjenta w celu zwalczania lub zapobiegania chorobom. Ich dostarczenie likwiduje zazwyczaj przyczyny choroby. Warto przy tym zwrócić uwagę, że nie jest to leczenie samych tylko objawów, terapia genowa usuwa bowiem źródło problemu. Pojęcie terapii genowej obejmuje wszystkie techniki bazujące na zastosowaniu kwasów nukleinowych w celach terapeutycznych. Terapia taka polega na leczeniu pacjentów z zastosowaniem kwasów nukleinowych (NA) (kwas dezoksyrybonukleinowy DNA oraz rybonukleinowy RNA), które pełnią wiele różnych funkcji w organizmie. Ich podstawowym zadaniem jest przechowywanie, kodowanie (DNA), transport (tRNA) i ekspresja informacji genetycznej w nich zawartej. Spełniają one również funkcje regulatorowe (dzięki istnieniu takich form jak siRNA, shRNA) oraz katalityczne (snRNA, rRNA [17 – 18]). Dostarczenie kwasu nukleinowego do komórki

np. plazmidu DNA (pDNA) może być stosowane do ekspresji określonego białka lub enzymu w komórkach lub jak to ma miejsce w przypadku krótkiego interferującego RNA (siRNA) do wyciszenia takiego białka [19].

W związku z powyższym, obecnie stało się możliwe leczenie pewnych chorób genetycznych takich jak wrodzonej ślepoty Lebera [20], ciężkiego złożonego niedoboru odporności [21] czy ciężkiej postaci hemofilii B [22]. Problemem jest to, że kwasy nukleinowe są naładowane ujemnie ze względu na to, że w swej strukturze zawierają fosfodiestrowy łańcuch główny [23], co uniemożliwia im przedostanie się przez błonę komórkową [24]. Elektrostatyczne odpychanie pomiędzy ujemnie naładowanym kwasem nukleinowym a ujemnie naładowaną błoną komórkową uniemożliwia również endocytozę, czyli transport NA do komórki wewnątrz fragmentu błony komórkowej, zwanego kaweolą [24]. W związku z tym, niezbędne są systemy dostarczania służące do efektywnego transportu i uwalniania kwasów nukleinowych w komórkach. Najefektywniejszym sposobem dostarczenia kwasów nukleinowych do komórek jest zastosowanie nośników zwanych wektorami. Ostatnie badania [25] koncentrują się na znalezieniu takich wektorów, które zapobiegają elektrostatycznemu odpychaniu występującemu pomiędzy błoną komórkową i NAs, co prowadzi do łatwiejszego przenikania takich kompleksów przez błonę komórkową. Najbardziej powszechnie stosowane systemy dostarczania kwasów nukleinowych mogą być podzielone na biologiczne (wirusowe) i niebiologiczne (niewirusowe). Układy z obydwu wyżej wymienionych grup wykazują specyficzne dla nich zalety i ograniczenia [26].

2.2 Różne rodzaje wektorów

2.2.1 Wektory wirusowe

Zgodnie z bazą danych Gene Therapy Clinical Trials Worldwide [27], prawie 70% testów klinicznych jest przeprowadzanych z wykorzystaniem wektorów wirusowych. Systemy takie oparte są na wirusach, czyli organicznych cząsteczkach zawierających w swej białkowej otoczce (kapsydzie) materiał genetyczny w postaci DNA lub RNA. Mają one zdolność powielania własnych genów po zainfekowaniu gospodarza, co czyni je bardzo wydajnymi nośnikami terapeutycznego kwasu nukleinowego [28]. Przy ich zastosowaniu w terapii genowej usuwany jest naturalny materiał genetyczny wirusa i wprowadzany ten terapeutyczny. Wprawdzie nośniki biologiczne w formie wirusów posiadają wysoką wydajność dostarczania NAs, ale są trudne do wytworzenia, a ponadto

mogą wykazywać toksyczne właściwości i powodować odpowiedź układu immunologicznego [29]. Ograniczenia takie nie sprzyjają wykorzystaniu systemów wirusowych do dostarczania kwasów nukleinowych. W związku z powyższym prowadzone są obecnie prace nad cząsteczkami wirusopodobnymi, które w założeniu mają nie powodować aktywacji układu immunologicznego [30]. Poniżej przedstawiono wirusy, które są najczęściej stosowane jako wektory.

- **Adenowirusy** są rodziną wirusów odpowiedzialnych za łagodne infekcje dróg oddechowych, czyli przeziębienie. Ich średnie rozmiary to 90 – 100 nm. Materiałem genetycznym, który zawierają wewnątrz swojego kapsydu, jest dwuniciowy DNA. Z tych wirusów usuwany jest fragment DNA pozwalający na namnażanie się wirusów i zastępowany tym, który będzie użyty w celach terapeutycznych. Adenowirusy poprzez białka kapsydu odnajdują i przyłączają się do receptorów błony komórkowej. Ze względu na brak genu pozwalającego wirusowi na namnażanie, nie zakaża on innych komórek, co stanowi zabezpieczenie przed niekontrolowanym powielaniem się wirusa. Wektory tego typu są jednak silnie immunogenne i cytotoksyczne w dużych dawkach [29].

- **Retrowirusy** są grupą wirusów będącą najczęstszą przyczyną biegunki wśród niemowląt i dzieci. Zawierają one materiał genetyczny w postaci dwóch jednakowych cząsteczek RNA. Dużym plusem jest to, że retrowirusy nie wywołują silnej reakcji immunologicznej. Również dzięki konieczności przepisywania informacji z RNA wirusowego na DNA i wstawienie go do genomu gospodarza, białka produkowane są przez dłuższy czas. Jednakże proces ten stwarza ryzyko wywołania mutacji, gdyż integracja ta ma charakter przypadkowy [31].

- **Wirusy towarzyszące adenowirusom** (AAV, ang. Adeno-Associated Virus) to pozbawione otoczki lipidowej wirusy o średnicy ok. 22 nm. Zawierają w swojej cząsteczce jednoniciowe DNA. Dużą zaletą jest słaba odpowiedź immunologiczna skierowana przeciwko AAV. Dotąd nie powiązano ich z żadną chorobą i są pozbawione genów niezbędnych do namnażania się, a do ich powielania się wymagana jest obecność innego wirusa, zwanego wirusem pomocniczym (najczęściej adenowirusa). Problemem jest jednakże hodowla tychże wirusów, ponieważ nie mogą się one same namnażać, zatem niezbędne są komórki-inkubatory, w których wirusy te są wytwarzane, co utrudnia ich produkcję w laboratoriach [32].

- **Lentivirusy** należą do grupy retrowirusów, jednakże posiadają cechy wyróżniające je z tej grupy. Posiadają zdolność wnikania do wczesnych, macierzystych komórek szpiku, co

może w przyszłości okazać się znaczące, gdyż komórki takie w późniejszym stadium różnicują się na komórki mięśniowe czy nerwowe [110]. Cechuje je także wysoka zdolność wprowadzenia nowego materiału genetycznego do komórki.

Możliwe jest także konstruowanie wektorów opartych na białkach wirusowych, które organizują się w cząsteczki wirusopodobne (tzw. VLPs – virus-like particles). Posiadają one wszystkie cechy wektora wirusowego, jednakże nie zawierają wirusowego genomu, co czyni je bardzo obiecującymi i z założenia bezpiecznymi w stosowaniu [33]. Zdarzały się jednak przypadki, kiedy tego typu cząsteczki powodowały odpowiedź immunologiczną. Również produkcja VLPs za pomocą hodowli komórkowych (w liniach komórkowych ssaków, owadów, drożdży czy też komórek roślinnych) ogranicza ich zastosowanie ze względu na niski poziom wydajności produkcji [34].

2.2.2 Wektory niewirusowe

Dzięki obecnie stosowanym metodom syntezy istnieje możliwość wytworzenia wektorów niewirusowych, które zdają się być doskonałymi materiałami do dostarczania kwasów nukleinowych. Należy podkreślić, że metody te umożliwiają wytworzenie materiałów w sposób ściśle zaplanowany odnośnie ich architektury i właściwości. Niewirusowe systemy dostarczania wykorzystują głównie zasadę oddziaływania elektrostatycznego z ujemnie naładowanymi kwasami nukleinowymi i mają charakter polikationów. Systemy takie zwiększają wydajność transfekcji m.in. przez zmniejszenie oddziaływań odpychających między ujemnymi ładunkami kwasów nukleinowych i ujemnie naładowaną błoną cytoplazmatyczną, zmniejszenie rozmiarów poprzez kompaktowe upakowanie kwasów nukleinowych i zwiększenie wydajności endocytozy. Systemy niewirusowe charakteryzują się stosunkowo niskimi kosztami produkcji, wysoką pojemnością kompleksowania NA i niską odpowiedzią immunologiczną [35].

Wśród wektorów niewirusowych można wyróżnić następujące typy:

- **Polipleksy**, które są kompleksami opartymi na kationowych polimerach, w tym dendrymerach, polimerach gwiazdzistych, liniowych i kopolimerach. Do tej grupy należą również polipeptydy syntetyczne. Wiele materiałów tego rodzaju jest już z powodzeniem testowanych na modelach zwierzęcych. Do głównych reprezentantów tego typu należą polipleksy oparte na poniżej przedstawionych polimerach.

- Poli(L-lizyna) (PLL) która jest liniowym polipeptydem otrzymanym poprzez polimeryzację naturalnego aminokwasu (L-lizyny). Kondensacja kwasu nukleinowego przez PLL ogranicza promień hydrodynamiczny kwasów

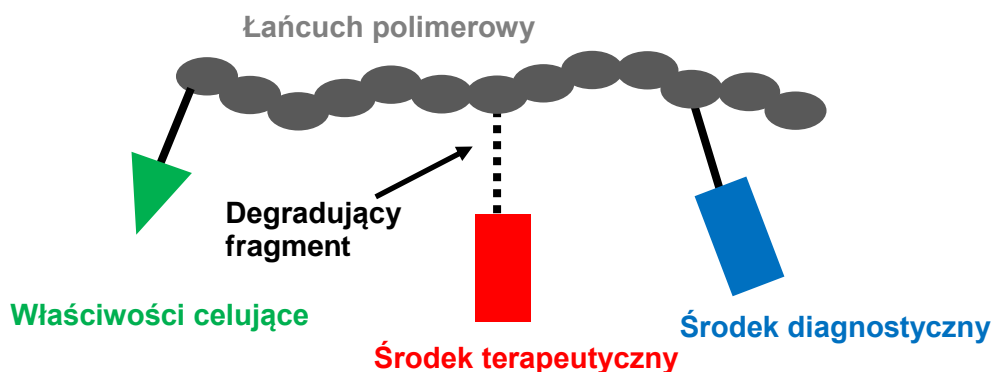
nukleinowych do odpowiedniej średnicy co pozwala na endocytozę i neutralizację anionowych ładunków na powierzchni kwasu nukleinowego, dzięki czemu zmniejszeniu ulega odpychanie elektrostatyczne w stosunku do błony komórkowej. Również wysoki dodatni ładunek powierzchniowy kompleksów PLL sprawia, że są one szybko usuwane z organizmu. Te cechy kompleksu PLL wraz z właściwościami chroniącymi go przed zewnętrznym atakiem nukleazy (enzym tnący kwasy nukleinowe) zapewniają zwiększenie wydajności dostarczania NA do komórek.

- Poli(etylenoimina) (PEI) została uznana za jeden ze złotych standardów wśród niewirusowych nośników ze względu na jej wysoką wydajność transfekcji. Zdolność tę zawdzięcza prawdopodobnie wysokiemu uprotonowaniu (nawet co trzeci atom PEI może być uprotonowany). PEI może występować w postaci liniowej i rozgałęzionej. Ciężar cząsteczkowy tego polimeru również wpływa na efektywność dostarczania kwasu nukleinowego. PEI o wysokiej masie cząsteczkowej jest zalecana dla skutecznego dostarczania DNA, natomiast PEI o niskiej masie cząsteczkowej (mniejszej niż 2 kDa) wykazuje większą skuteczność w dostarczaniu krótszych fragmentów kwasów nukleinowych takich jak mRNA (informacyjny RNA) [36]. Szczepienie biokompatybilnymi polimerami takimi jak np. PEG jest inną ważną strategią stosowaną w celu zmniejszenia cytotoksyczności PEI [37].
- Dendrymer poli(amidoaminowy) (PAMAM) był pierwszym dendrymerem, który został zsyntetyzowany, scharakteryzowany i skomercjalizowany. Charakteryzuje się on dużą wydajnością transfekcji i jest komercyjnie dostępnym czynnikiem transfekującym. Dendrymer jest typem polimeru, który ma dobrze zdefiniowaną, rozgałęzioną strukturę [38]. Procedury stopniowej syntezy pozwalają na precyzyjną kontrolę rozmiaru, kształtu, funkcjonalności i wytworzenie dendrymerów o bardzo niskiej polidispersyjności. Dendrymery mają duży potencjał aplikacyjny ze względu na jednorodny rozkład ładunków w cząsteczce i niską cytotoksyczność [39].
- **Lipopleksy** są kompleksami opartymi na cząsteczkach amfifilowych (np. lipidach) i charakteryzują się właściwościami kationowymi. W budowie lipidów, które są pochodnymi glicerolu, można wyróżnić hydrofilową głowę oraz hydrofobowy ogon. Ich zdolność do samoorganizacji w środowisku wodnym oraz ładunek elektryczny fragmentów hydrofilowych umożliwia kondensację kompleksowanego z nimi kwasu nukleinowego.

Najbardziej stabilną strukturą, jaką tworzą lipidy w środowisku wodnym, jest dwuwarstwa zamknięta w pęcherzyk nazywany liposomem. Dzięki tym właściwościom mogą one potencjalnie zostać wykorzystane jako wektory do dostarczania kwasów nukleinowych [40].

3 POLIMERY DO ZASTOSOWAŃ BIOLOGICZNYCH

Polimery mogą być zaprojektowane w nieimmunogennej i biokompatybilnej postaci, i posiadać różne właściwości fizykochemiczne oraz miejsca mocowania dla kowalencyjnych lub niekowalencyjnych modyfikacji. Teoretycznie są one doskonałą platformą nośnika leku dla ukierunkowanej, powtarzanej aplikacji leków powodujących długotrwałe efekty terapeutyczne. Aby polimery mogły być użyteczne do zastosowań biologicznych jako nośniki leków oraz kwasów nukleinowych i aby uzyskać powtarzalne parametry dostarczania tych substancji *in vivo* i *in vitro* bardzo ważnym zadaniem jest zaprojektowanie takiego polimeru, a następnie układu polimer – kwas nukleinowy lub lek (tzw. polipleks), który w środowisku wewnątrzkomórkowym nie zmieni swojego składu i będzie zawierał ściśle określoną kompozycję tych dwóch składników [41]. Mimo, że podejmowane są próby wyjaśnienia w jaki sposób składniki krwi mogą destabilizować nanocząsteczki polimerowe, to wciąż zbyt mało wiemy o tym procesie. Istotne jest zdobycie wiedzy o tym jak właściwie działa dany układ dostarczający lek czy też kwas nukleinowy i w jaki sposób pośredniczy on w ekspresji lub wyciszeniu danego genu [42 – 43]. Dlatego też bardzo ważnym celem prowadzonych obecnie badań naukowych jest projektowanie i synteza dokładnie zdefiniowanych polimerów, które powinny posiadać podstawowe właściwości dobrego wektora.



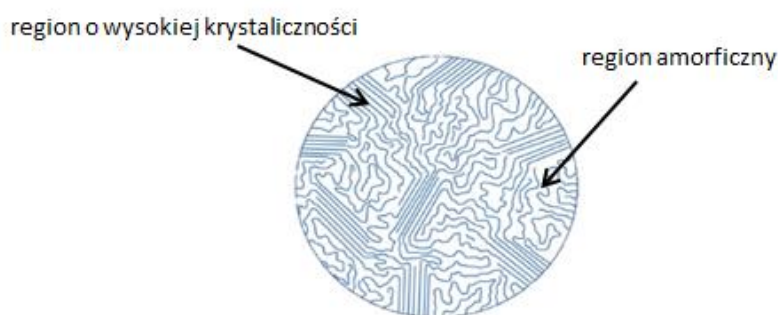
Rysunek 2 Schematyczne przedstawienie idealnego wektora polimerowego [45]

Istotne w przypadku wektorów polimerowych jest to, aby były one biokompatybilne – nieszkodliwe dla komórek organizmu żywego, aby były funkcjonalne lub mogły zostać sfunkcjonalizowane oraz aby stanowiły ochronę ładunku, który przenoszą i mogły zostać usuwane z komórek w sposób możliwie najbardziej naturalny i nieszkodliwy [44]. Zaletą mogą być takie ich właściwości, które ułatwiają dostarczanie przenoszonej przez nie zawartości (zmiana ich struktury pod wpływem temperatury, pH lub innych czynników)

oraz ich degradowalność (Rysunek 2) [45]. Dodatkowym atutem stosowania polimerów jako wektorów do dostarczania leków czy kwasów nukleinowych jest ich stosunkowo łatwa aplikacja i relatywnie niskie koszty produkcji. Nadają się one również do wysoce wydajnej produkcji na dużą skalę, a także charakteryzują się stabilnością podczas przechowywania.

3.1 Krystaliczność polimerów

Makrocząsteczki łańcuchowe o dostatecznie regularnej budowie mogą być ułożone względem siebie w sposób regularny, tworząc fazę krystaliczną. Należy jednak zaznaczyć, że nie spotyka się polimerów całkowicie krystalicznych. Polimery amorficzne są natomiast układami, których makrocząsteczki nie mają wystarczającej regularności w budowie, co skutkuje brakiem ich przestrzennego uporządkowania dalekiego zasięgu. Rejony krystaliczne, którym towarzyszą obszary amorficzne, można wyodrębnić w polimerach semikrystalicznych (Rysunek 3). W takich polimerach domeny krystaliczne i amorficzne sąsiadują ze sobą, wzajemnie się ze sobą przeplatając. Fazę krystaliczną cechuje większa gęstość upakowania łańcuchów, jak i mniejsza objętość swobodna w porównaniu z fazą amorficzną. Ilościową miarę stopnia uporządkowania struktury polimeru określa stopień krystaliczności, który opisuje ułamkową zawartość fazy krystalicznej w polimerze. Obecność kryształitów skutkuje większą sztywnością polimeru, zapewniając stabilizację jego struktury. Zwiększenie stopnia krystaliczności układu polimerowego wpływa również na polepszenie takich parametrów mechanicznych jak odporność na ścieranie, twardość i wytrzymałość na rozciąganie.



Rysunek 3 Schematyczne przedstawienie regionów krystalicznych i amorficznych w polimerze semikrystalicznym

W wielu polimerach semikrystalicznych występują struktury sferolityczne, które są kulistymi agregatami anizotropowych kryształów. Kryształy są zorientowane w określony

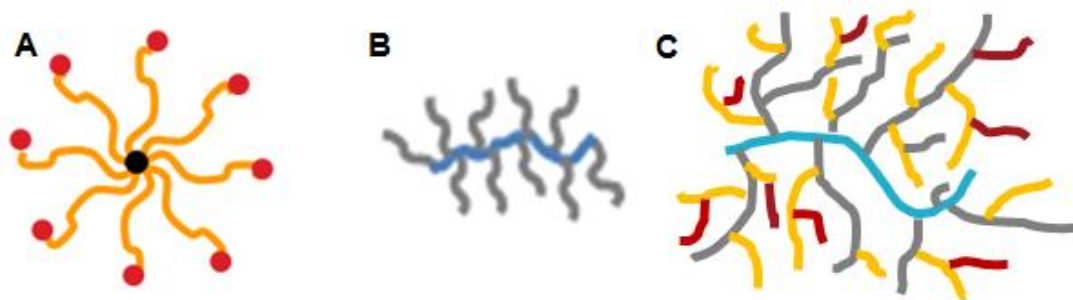
sposób względem promienia sferolitu, co wiąże się z występowaniem różnorodnych form sferolitów m.in. radialnych, pierścieniowych czy iglastych, które są zależne od budowy makrocząsteczek, historii termicznej układu polimerowego oraz warunków zewnętrznych, w jakich zachodzą procesy krystalizacji. Krystality w sferolicie są rozdzielone obszarami amorficznymi, w których występują m.in. fragmenty łańcuchów łączące pobliskie lamele, pętle i końce łańcuchów. W tej części znajdują się również odgałęzienia i fragmenty łańcuchów o odmiennej strukturze chemicznej lub konfiguracji, które nie wbudowały się w kryształ [46]. Obecność rozgałęzień w łańcuchu polimerowym obniża zdolność polimeru do krystalizacji.

Proces krystalizacji polimerów przebiega zwykle dwuetapowo. W pierwszym etapie zachodzi zarodkowanie, które polega na powstawaniu w stopionym polimerze stabilnych zarodków, na których w drugim etapie zachodzi dalszy wzrost krystalitów. Etap zarodkowania decyduje o ilości i wielkości powstających sferolitów. Zwiększenie kontroli nad procesem zarodkowania można zapewnić poprzez dodawanie różnego rodzaju substancji powodujących zwiększenie, bądź zmniejszenie gęstości zarodkowania. Wielkość krystalitów w polimerze zależy od jego budowy chemicznej, masy cząsteczkowej, warunków krystalizacji (m.in. temperatury w jakiej prowadzony jest proces), jak również od historii termicznej układu. W przypadku struktur sferolitycznych można ponadto wyróżnić krystalizację pierwotną obejmującą radialny wzrost sferolitów, zachodzący ze stałą szybkością, który kończy się wówczas, gdy sferolity wypełniają całkowicie objętość stopionej próbki oraz krystalizację wtórną, polegającą na dalszym powolnym, częściowym porządkowaniu łańcuchów w fazie amorficznej, wypełniającej przestrzeń pomiędzy krystalitami.

3.2 Polimery gwiaździste

3.2.1 Budowa polimerów gwiaździstych

Polimery mogą być klasyfikowane ze względu na architekturę (topologię), kompozycję i funkcjonalność. Można wyróżnić dwa typy topologii – polimery liniowe i rozgałęzione. Wśród polimerów rozgałęzionych na szczególną uwagę zasługują polimery gwiaździste (Rysunek 4A), które charakteryzują się tym, że mają tylko jedno miejsce rozgałęzienia ramion [7]. Do tej grupy należą również szczotki polimerowe i polimery hiperrozgałęzione przedstawione na rysunku 4 B i C.



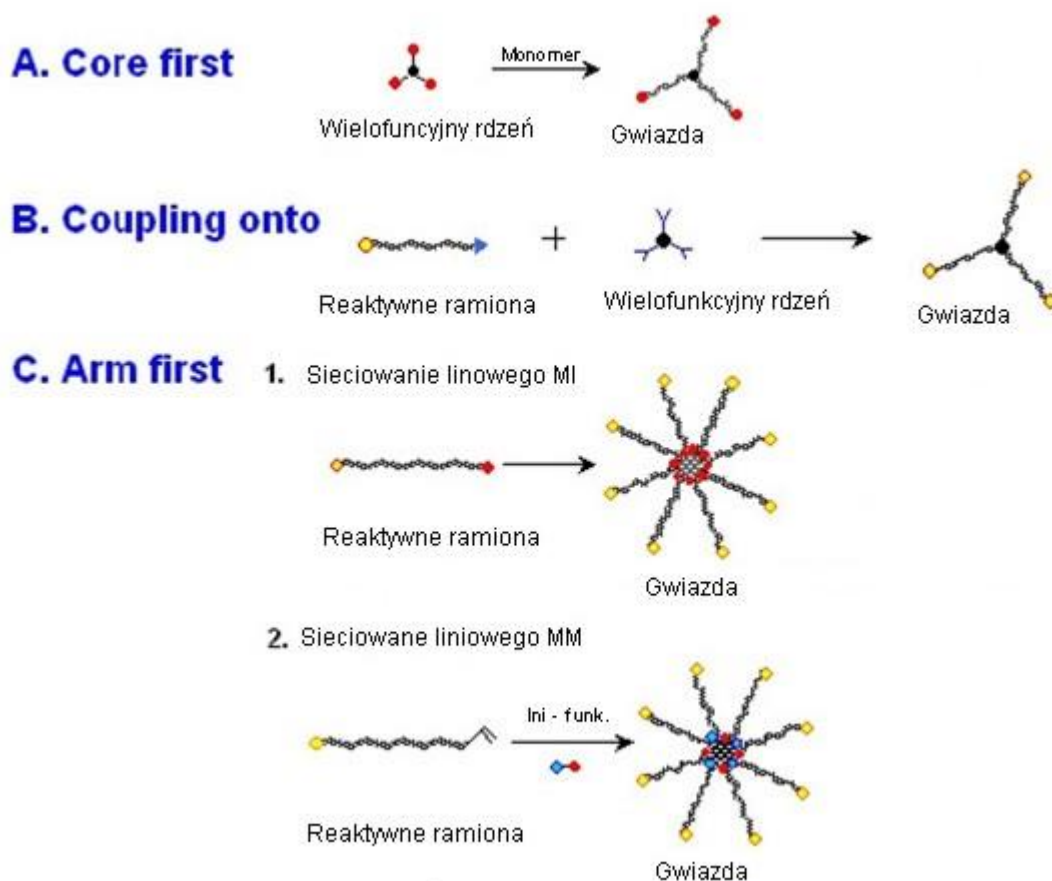
Rysunek 4 Różne podtypy rozgałęzionych polimerów A) gwiazdziste, B) szczotki i C) statystycznie rozgałęzione (dendrytyczne)

Polimery gwiazdziste składają się z rdzenia i przyłączonych do niego, rozchodzących się promieniście, od kilku (co najmniej trzech) do kilkudziesięciu, łańcuchów polimerowych (Rysunek 4A) [47]. Wówczas, gdy rdzeń jest co najmniej o rząd wielkości mniejszy niż cała cząsteczka, to jego wpływ na właściwości polimeru może zostać pominięty [48 – 49]. Wśród polimerów gwiazdzistych można wyróżnić układy symetryczne, których cząsteczki zbudowane są z ramion jednego typu oraz każda z nich zawiera jednakową liczbę ramion o takiej samej długości (typ „homoarm”). Drugim typem polimerów gwiazdzistych są takie, które wykazują asymetrię tj. ramiona molekuł tego typu polimerów gwiazdzistych mogą różnić się budową chemiczną lub mogą występować różnice długości ramion w obrębie jednej molekuly (typ „miktoarm”). Polimery takie mogą wykazywać zależność właściwości chemicznych i fizycznych od składu ramion, co pozwala na ich szerokie zastosowanie między innymi w dziedzinach takich jak systemy dostarczania leków czy systemy optyczne [50]. Zaprojektowanie i synteza symetrycznych polimerów gwiazdzistych o ściśle zdefiniowanej architekturze były przedmiotem wielu badań naukowych [51].

3.2.2 Podstawowe sposoby syntezy polimerów gwiazdzistych

Istnieją trzy podstawowe strategie syntezy polimerów gwiazdzistych (Rysunek 5) (niezależne od stosowanej techniki polimeryzacji), różniące się głównie kolejnością, w jakiej tworzony jest rdzeń i ramiona gwiazdy [10]. Metody typu „grafting from” albo „core first” wykorzystują do syntezy mały, wielofunkcyjny rdzeń, do którego w trakcie reakcji polimeryzacji przyłączają się kolejne monomery, w wyniku czego powstają ramiona molekuly polimerowej. W metodach typu „arm-first” reakcja polimeryzacji przebiegać może na dwa sposoby. W pierwszym, typu „grafting through”, materiałem

wyjściowym są ramiona, będące makroinicjatorami lub makromonomerami, łączące się ze sobą za pośrednictwem dodatkowego reagentu (zwanego cross linkerem), który posiada co najmniej dwa wiązania winylowe [52]. W przypadku drugiego sposobu polimeryzacji, typu „coupling onto”, ramiona gwiazdy polimerowej tworzone są poprzez przyłączenie liniowych polimerów, zawierających reaktywne funkcyjne grupy końcowe, w wyniku reakcji chemicznej (np. ligacji) do odpowiednio do tego celu przygotowanego wielofunkcyjnego rdzenia.



Rysunek 5 Podstawowe sposoby syntezy polimerów gwiazdzistych [53]

W przypadku każdej z wyżej wymienionych metod można wymienić jej wady i zalety w zależności od tego, jaki produkt planuje się otrzymać i jakie przewiduje się jego zastosowanie. Polimery gwiazdziste otrzymane metodą „grafting-through” ze względu na losowe przyłączanie ramion do rdzenia w trakcie jego sieciowania, wykazują stosunkowo duży rozkład ilości ramion, a tym samym masy cząsteczkowej [54]. Z kolei sposób „grafting-to”/„coupling onto” wymaga przed rozpoczęciem polimeryzacji polimerów gwiazdzistych wprowadzenia odpowiednich grup funkcyjnych zarówno na końcach łańcuchów polimerowych, jak też w samym rdzeniu. W związku z obecnym rozwojem

metod przyłączania (np. tzw. reakcji click), stosowanie wyżej wymienionych metod staje się coraz łatwiejsze. W przypadku metody typu „core-first” pojawiają się problemy związane ze stosowanymi technikami polimeryzacji rodnikowych prowadzące do reakcji sprzęgania pomiędzy tworzącymi się gwiazdami, co skutkuje szerokim rozkładem mas cząsteczkowych polimerów otrzymanych tą metodą. Efekt ten można jednak zminimalizować utrzymując konwersję monomeru na niskim poziomie (poniżej 30%) [52]. Wszystkie te metody charakteryzują się bardzo dużą wydajnością wytwarzania polimerów gwiazdzistych o dobrze zdefiniowanej strukturze [55]. W niniejszej pracy zastosowano metodę „arm-first” mając na celu uzyskanie polimerów gwiazdzistych o dużej liczbie ramion oraz wprowadzenie funkcjonalnych elementów do rdzenia gwiazdy.

3.2.3 Zastosowanie polimerów gwiazdzistych w biologii i medycynie

Mimo wyraźnego postępu w dziedzinie inżynierii układów polimerowych przeznaczonych do dostarczania kwasów nukleinowych, istnieje jeszcze wiele ograniczeń dotyczących stosowania tego typu wektorów, a związanych między innymi z ich cytotoksycznością, z niską wydajnością transfekcji, a także ze słabo zdefiniowanymi strukturami materiałów wytworzonych w procesie polimeryzacji rodnikowej. W ostatnim dziesięcioleciu rozwój metod kontrolowanej polimeryzacji rodnikowej (CRP) pozwolił na syntezę polimerów o dobrze określonej strukturze i wąskim rozkładzie masy cząsteczkowej, które mogą być używane do dostarczania kwasów nukleinowych do komórek [15].

Niewirusowe systemy dostarczania są proste w produkcji, bezpieczne i stabilne. W wyniku syntezy uzyskuje się układy o różnych kształtach i rozmiarach, mogące zawierać różnorodne grupy funkcyjne. Celowane dostarczenie może być realizowane dzięki umieszczonym na powierzchni wektora grupom funkcyjnym, rozpoznawalnym przez receptory znajdujące się na powierzchni komórek, do których dany wektor ma wniknąć i dla których został zaprojektowany. Grupa funkcyjna musi być specyficzna dla danego receptora, co oznacza, że tylko ten konkretny receptor będzie ją rozpoznawał i pozwalał na łatwiejsze i szybsze wniknięcie wektora do komórki. Wielu naukowców pracuje nad statystycznymi lub blokowymi kopolimerami, które mogą być używane do dostarczania kwasów nukleinowych (NA) [56]. Wiadomo jednak, że układy takie mają niższą wydajność transfekcji, w porównaniu do układów polimerowych o architekturze gwiazdy lub szczotki [57]. Architektura polimeru może mieć wpływ na jego właściwości, powodując różnice w cytotoksyczności, możliwościach kompleksacji kwasów

nukleinowych i wydajności transfekcji. Polepszenie właściwości polimerów można również uzyskać poprzez wprowadzenie do ich struktury monomerów funkcyjnych.

W celu poprawy parametrów dostarczania kwasów nukleinowych podejmowane są próby zastosowań układów o bardziej zaawansowanej architekturze, takich jak dendrymery lub polimery gwiazdziste. Stosowanie tych pierwszych jest jednak ograniczone ze względu na ich wieloetapową syntezę, żmudny proces oczyszczania, a tym samym wysokie koszty ich otrzymywania, stąd zainteresowanie naukowców skupia się aktualnie na polimerach gwiazdzistych. Własności strukturalne polimerów gwiazdzistych o ramionach, które stanowią łańcuchy PEO zostały szeroko opisane w literaturze [58 – 60].

Wiele prób zostało podjętych w celu zbadania właściwości innych typów polimerów gwiazdzistych, jak również uzyskania specyficznych właściwości tego typu układów przez wprowadzenie odpowiednich grup funkcyjnych do ich struktury [61]. Obecnie prowadzone są prace naukowe nad wykorzystaniem polimerów gwiazdzistych jako wektorów do dostarczania peptydów [62] i leków [63].

3.3 Polimery kationowe

Podawanie miejscowe wektorów kwasów nukleinowych polegające na przykład na dostarczaniu aerozolu do płuc, iniekcjach domięśniowych [64 – 65], domózgowych, doocznych [66] czy też do wyizolowanych guzów [67] może być bardzo przydatne dla leczenia niektórych chorób. W przypadku wielu zastosowań terapeutycznych, korzystniejsze mogłoby być dożylnie leczenie ogólnoustrojowe. Istnieją jednakże liczne przeszkody związane z niezamierzonymi oddziaływaniami wektorów z powierzchniami biologicznymi, w tym z białkami krwi, błonami zewnątrzkomórkowymi, komórkami immunologicznymi oraz komórkami innymi niż docelowe, które powodują, że jedynie niewielka frakcja nośnika osiąga konkretną tkankę docelową. Kationowe polimery stosowane do tworzenia polipleksów aktywują układ odpornościowy [68], co powoduje ich szybkie usunięcie z organizmu [69]. Dysocjacja polipleksów wywołana przez białka surowicy lub macierzy pozakomórkowej stanowi również istotną przeszkodę [70]. Niektóre z tych problemów można rozwiązać poprzez modyfikację polipleksów poli(glikolem) etylenowym (PEG), czyli zastosowanie tzw. PEGylacji, która została szeroko zbadana jako metoda dla ochrony ("ukrywania") powierzchni wielu nośników opartych na liposomach czy innych nanocząsteczkach. W przypadku polimerów kationowych Plank i inni [68] wykazali, że aktywacja układu dopełniacza może być zmniejszona poprzez PEGylację nośników polimerowych. Taka modyfikacja może mieć

miejsce przed lub po utworzeniu polipleksu, lub może dotyczyć ona bezpośrednio kwasu nukleinowego [71]. PEGylacja polipleksu poprawia jego rozpuszczalność, zmniejsza oddziaływanie z komórkami krwi i białkami osocza krwi, zapewnia lepszą biokompatybilność i przedłuża czas przebywania polipleksu w krwiobiegu [69].

Polimery kationowe wykazują wysoką zdolność wiązania z kwasami nukleinowymi i tym samym mogą je skutecznie dostarczać do komórek na drodze endocytozy [72]. Prowadzone są badania nad syntezą i charakterystyką polimerów kationowych składających się z takich monomerów jak metakrylan 2-dimetyloamino etylu (DMAEMA) czy też chlorek [2-(metakryloiloksy) etyl]o] trimetyloamoniowy (MeDMA) [73]. Obecnie podejmowane są próby syntezy polimerów charakteryzujących się krótszym czasem przebywania w organizmie i bardziej biokompatybilnych [19, 74]. Jednym z najczęściej stosowanych podejść do problemu jest kopolimeryzacja kationowych monomerów z biokompatybilnymi polimerami takimi jak np. politlenek etylenu (PEO) w celu neutralizacji toksycznego wpływu ładunku na komórki żywe [75]. PEO jest szczególnie obiecującym materiałem [76], ponieważ jest on polimerem niejonowym i zgodnym biologicznie. Nie tylko nie jest rozpoznawany przez układ odpornościowy jako szkodliwy czynnik, lecz również charakteryzuje się takimi szczególnymi właściwościami, jak stabilność chemiczna, dobra rozpuszczalność w wodzie i nietoksyczność.

3.4 Polimery biodegradowalne

W dziedzinie biomedycyny, polimery biodegradowalne można zdefiniować jako polimery, które ulegają rozkładowi do związków o małej masie cząsteczkowej w warunkach fizjologicznych lub w organizmie, w czasie znacznie krótszym niż długość ludzkiego życia. Znaczenie polimerów biodegradowalnych dla zastosowań biomedycznych wzrasta coraz bardziej [77], gdyż wykazują one wiele zalet w porównaniu z polimerami niedegradowanymi. Po pierwsze nie jest konieczne stosowanie odpowiednich procedur mających na celu usunięcie tych polimerów z organizmu, kiedy cel zostały osiągnięty i spełniły one zadania, do których zostały zaprojektowane. Po drugie, produkty degradacji o niskiej masie cząsteczkowej (wytworzone w wyniku rozkładu polimerów biodegradowalnych) mogą być metabolizowane i wydalane, a tym samym nie powodują długoterminowej toksyczności [78]. Również sam proces degradacji, z pozoru mało znaczący, może spełniać określoną funkcję, na przykład, przy użyciu układu biodegradowalnego można uzyskać efekt powolnego uwalniania leków kontrolowany poprzez mechanizmy uwalniania zależne od warunków degradacji.

Polimery biodegradowalne można podzielić na naturalne i syntetyczne. Typowymi przykładami naturalnych polimerów ulegających biodegradacji są białka, polisacharydy oraz kwasy nukleinowe. Ich zaletą jest to, że są one hydrofilowe, a większość z nich jest rozpuszczalna w wodzie. Mankamentem jest natomiast to, że procesy ich otrzymywania są niekiedy wymagające, kosztowne i pracochłonne, dlatego poszukuje się coraz to nowszych syntetycznych materiałów biodegradowalnych.

Istnieje wiele polimerów biodegradowalnych, semi-krystalicznych lub amorficznych, które mogą być wykorzystane do zastosowań biomedycznych. Typowymi przykładami syntetycznych polimerów biodegradowalnych są poliamidy, poliestry [79], polibezwodniki [80], poliwęglany, poli (orto-estry), poliacetale [81], które mają różne właściwości i zdolności degradacji ze względu na odmienną strukturę molekularną.

W projektowaniu biodegradowalnych biomateriałów bardzo ważnym jest, aby nie wywoływały odpowiedzi immunologicznej i trwałego procesu zapalnego oraz aby ich czas degradacji był wystarczająco długi w celu spełnienia funkcji zaplanowanej dla nich w organizmie, jak również aby miały odpowiednie właściwości umożliwiające im swobodne poruszanie się w środowisku ich przeznaczenia. Istotnym zagadnieniem w procesie projektowania tego typu materiałów jest również to, aby produkty ich degradacji były nietoksyczne oraz mogły być łatwo wchłaniane lub wydalane.

3.5 Charakterystyka najważniejszych właściwości polipleksów

Polimery powinny być zaprojektowane w nieimmunogennej i biokompatybilnej postaci, z uwzględnieniem odpowiednich właściwości fizykochemicznych oraz miejsc mocowania przeznaczonych do przyłączania odpowiednich grup funkcyjnych w celu uzyskania kowalencyjnych lub niekowalencyjnych modyfikacji tych układów. Teoretycznie są one doskonałą platformą, do zastosowania jako nośnik leku, dla ukierunkowanej i powtarzanej aplikacji leków powodujących długotrwałe efekty terapeutyczne [82]. Wiązanie kwasu nukleinowego (NA) zależy od gęstości ładunku, wielkości, elastyczności i topologii polimerów. W literaturze można znaleźć przykłady badań wielu rodzajów układów polimerowych o różnej topologii jako wektorów do dostarczania NA m.in. polimerów liniowych, takich jak poli (L-lizyna) (PLL) [83 – 84], polietylenoimina liniowa (LPEI) [85] i innych [86], a także rozgałęzionych polimerów (np. rozgałęziona PEI – brPEI) [87] czy też dendrymerów, w tym poliamidoamin (PAMAMs) [88 – 89]. Stabilność polipleksów można zwiększyć poprzez wprowadzenie oddziaływań elektrostatycznych i wiązań wodorowych [90], a także modyfikacje polimerów grupami hydrofobowymi [91]. Bardzo

popularnym sposobem enkapsulacji kwasów nukleinowych jest umieszczanie ich w polimerowych klatkach [92] lub ich kowalencyjne sprzężanie z polimerem [93]. Polimery mogą dostarczyć ładunek do komórek bezpośrednio lub pośrednio (za pośrednictwem ukierunkowanych ligandów) i powodować wychwyt wewnątrzkomórkowy. Mogą one również uczestniczyć w wewnątrzkomórkowych etapach dostarczania, w tym również w procesie ucieczki endosomalnej i w transporcie NA w cytoplazmie oraz w wychwycie jądrowym. Podstawowym warunkiem, jaki powinien spełniać wysoce stabilny i chroniony polipleks jest jego czas krążenia w krwiobiegu bez niepożądanych oddziaływań (tak długo aż dotrze do komórki docelowej) [1].

4 PRZEGLĄD METOD EKSPERYMENTALNYCH

4.1 *Magnetyczny rezonans jądrowy*

4.1.1 Spektroskopia wysokiej rozdzielczości

Jednymi z najbardziej efektywnych narzędzi badawczych, umożliwiającymi przeprowadzenie kompleksowej charakterystyki dynamiki molekularnej, struktury lub procesów czasowo zależnych, są metody oparte na zjawisku magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR Nuclear Magnetic Resonance). Metody NMR, już od początku odkrycia zjawiska w 1945 roku [94 – 95] i komercjalizacji pierwszych spektrometrów, znalazły zastosowanie w chemii organicznej do identyfikacji substancji i stały się niezastąpionym narzędziem w badaniach struktury i konformacji molekuł. Doskonalenie aparatury, poznawanie zjawiska i opracowanie metodyki pomiarowej zaowocowały dalej rozwojem spektroskopii wysokorozdzielczej (High Resolution NMR), która wzmocniona implementacją przekształcenia Fouriera do komercyjnych spektrometrów NMR stała się potężnym narzędziem badawczym, rozwijanym do dnia dzisiejszego. Opracowanie metod wielowymiarowej spektroskopii NMR [96 – 97], a wraz z nią setek sekwencji pomiarowych dostępnych w niemal każdym nowoczesnym spektrometrze NMR, dzisiaj umożliwiają i ułatwiają prowadzenie badań interdyscyplinarnych, które jeszcze niedawno były niedostępne dla badaczy.

Metody magnetycznego rezonansu jądrowego rozwijały się wraz z poznawaniem zjawiska, którego opis można znaleźć w wielu pracach oryginalnych [98] i opracowaniach syntetycznych [99]. Można również znaleźć informacje na ten temat w szeregu dostępnych monografii z dziedziny NMR, wśród których znajdują się pozycje zróżnicowane pod względem stopniem zaawansowania opisu zjawiska od klasycznego do formalizmu operatora gęstości [100].

Różnorodność i liczność sekwencji pomiarowych, z których korzysta technika NMR związana jest z wszechstronnością zastosowania jej do badania specyficznych właściwości i procesów molekularnych. W związku z powyższym struktury białek, kwasów DNA czy RNA bada się korzystając najczęściej z dwuwymiarowej, wielojądrowej spektroskopii wysokorozdzielczej NMR (2D NMR) [101]. Badania dynamiki dużych molekuł, dla których reorientacje molekuł scharakteryzowane są długimi czasami korelacji, wykonuje się stosując dwuwymiarowe sekwencje spektroskopii wymiennej [102], najczęściej na

próbekach z selektywnie podstawionymi izotopami w odpowiednich pozycjach w molekuale. Takie podejście znacznie upraszcza uzyskane z eksperymentu widma dwuwymiarowe, a tym samym i interpretację uzyskanego wyniku.

Do badań strukturalnych polimerów wykorzystuje się spektroskopię wysokiej rozdzielczości NMR, w której to rejestruje się wąskie linie NMR w postaci przesunięć chemicznych. W roztworach polimerów, przy wysokim stopniu jednorodności pola B_0 i odpowiedniego oddalenia protonów wzdłuż łańcucha cząsteczki, można osiągnąć bardzo dobrą rozdzielczość widm NMR. W rzeczywistości momenty magnetyczne jąder znajdują się w zróżnicowanym otoczeniu, które ma na nie wpływ. W związku z powyższym położenie sygnału NMR zależy w dużej mierze od otoczenia chemicznego jąder [103]. Zjawisko ekranowania prowadzi do zmiany odległości pomiędzy poziomami energetycznymi jądra, przez co sygnały NMR od ekranowanych protonów przesuwają się ku większym wartościom indukcji pola magnetycznego względem umownego wzorca jakim jest zazwyczaj tetrametylosilan (TMS). Zmianę położenia sygnałów rezonansowych w widmie NMR, spowodowaną chemicznym otoczeniem protonów, nazywamy przesunięciem chemicznym. Przesunięcie chemiczne zdefiniowane jest jako bezwymiarowa wielkość δ :

$$\delta = \frac{\nu_i - \nu_{wz}}{\nu_{wz}} 10^6 \quad (1)$$

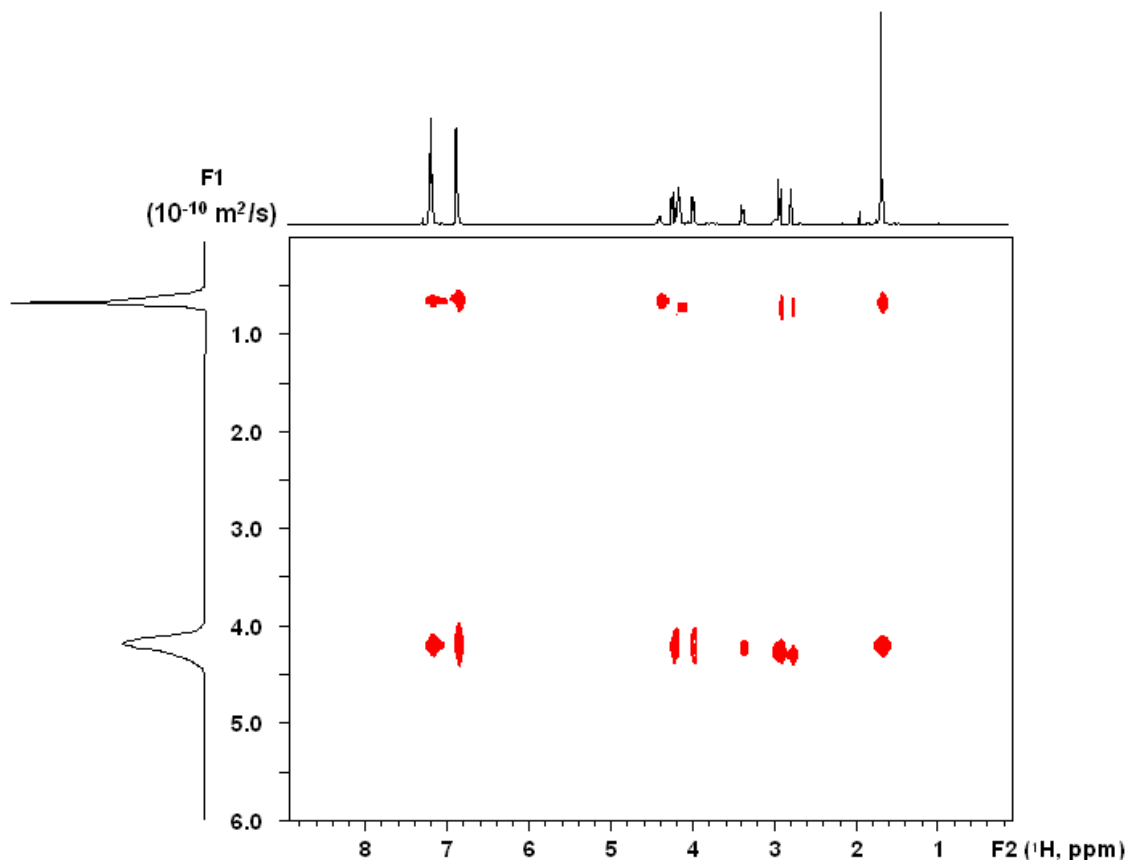
gdzie ν_i i ν_{wz} są odpowiednio częstotliwościami linii badanej substancji i wzorca, którym jest zwykle TMS. W związku z powyższym przesunięcie chemiczne nie zależy od indukcji pola B_0 , i jest podawane w jednostkach ppm. Wartość δ zależy między innymi od elektroujemności sąsiednich jąder (im bardziej elektroujemne sąsiedztwo tym większe przesunięcie), charakteru sąsiednich wiązań (wiązania podwójne, potrójne i aromatyczne pierścienie), a także obecności wiązań wodorowych, efektów rozpuszczalnikowych i efektów izotopowych.

4.1.2 Metoda DOSY

Nowoczesne metody badania ruchów translacyjnych molekuł, możliwe do realizacji poprzez bezpośredni pomiar współczynników samodyfuzji, korzystają z metody DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy). Wprowadzona przez Morrisa [104] na listę eksperymentów NMR jest dziś stosowana jako standardowa technika pomiarowa. Warto zwrócić uwagę, że metody umożliwiające pomiar współczynników samodyfuzji opracowane jeszcze przez Stejskala [105] umożliwiają „nieinwazyjny” pomiar

współczynników samodyfuzji, bez konieczności wprowadzania znaczników zaburzających badany układ. Zaznaczenie chwilowych pozycji molekuly, niezbędne do wyznaczenia współczynnika dyfuzji, odbywa się w sposób niezauważalny dla molekuł, a tym samym nie determinuje ich ruchu translacyjnego. Szczegółowy opis nowoczesnych metod pomiaru współczynnika dyfuzji translacyjnej lub samodyfuzji techniką NMR, wraz z dyskusją o możliwościach i granicach stosowalności metody, można znaleźć w wielu pozycjach literaturowych [106 – 107].

Poniżej opisano technikę DOSY zastosowaną do pomiaru współczynników samodyfuzji układów syntetyzowanych i diskutowanych w pracy. DOSY dyskryminuje (separuje) sygnały NMR ze względu na różnice w szybkości ruchów translacyjnych składników roztworu w próbce, charakteryzowanych współczynnikiem dyfuzji D . Wynikiem eksperymentu jest więc pseudo, najczęściej dwuwymiarowe widmo, w którym oś Y skalowana jest współczynnikiem dyfuzji. Możemy powiedzieć, że DOSY zwiększa zdolność rozdzielczą widm eksperymentalnych uwidaczniając w bezpośredni sposób ruchliwość składników roztworu. Przykładowe widmo DOSY, przedstawione na rysunku 6, do złudzenia przypomina widmo 2D wysokorozdzielczej spektroskopii NMR.



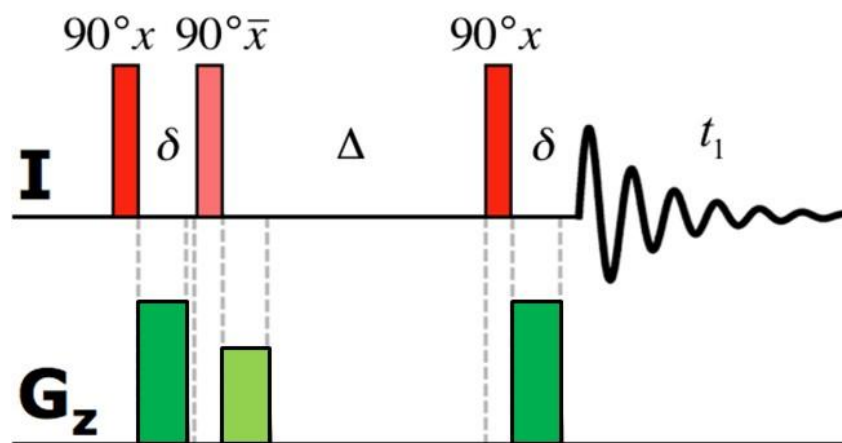
Rysunek 6 Przykładowe widmo DOSY

Jednak w przypadku DOSY jest to tylko superpozycja widm uzyskanych z niezależnych, jednowymiarowych eksperymentów ważonych współczynnikami dyfuzji. Dwuwymiarowe widma NMR najczęściej prezentowane są w formie wykresu typu „contour plot”, w którym oś X – skojarzona z przesunięciem chemicznym – wyskalowana jest w standardowych jednostkach stosowanych w widmach 2D, a oś Y koreluje wartości współczynników dyfuzji D wyznaczonych dla składników roztworu. Takie przedstawienie wyników eksperymentu uwidacznia względne różnice w ruchliwości translacyjnej molekuł i umożliwia wyznaczenie wartości parametrów charakteryzujących ruch. Przyjmując założenia modelu hydrodynamicznego i korzystając z równania Einsteina-Stockesa, korelującego współczynnik dyfuzji D z promieniem hydrodynamicznym molekuly, można oś Y widma DOSY przeskalować na promień hydrodynamiczny dyfundującej molekuly korzystając z poniższego wzoru:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_h} \quad (2)$$

gdzie: k – stała Boltzmana; T – temperatura; η – lepkość roztworu; R_h – promień hydrodynamiczny.

DOSY jest dzisiaj synonimem grupy eksperymentów zawierającej sekwencje pomiarowe stosowane do pomiaru współczynników dyfuzji i zaprojektowane z myślą o jak najszerszym obszarze zastosowań. Wśród nich można znaleźć podgrupy sekwencji typu 2DDOSY, 3DhomoDOSY i 3DheteroDOSY. W zależności od implementacji pakietu DOSY, każda podgrupa może zawierać inne menu dostępnych sekwencji, jednak standardem jest obecność sekwencji umożliwiających przeprowadzenie pomiarów współczynników dyfuzji dla próbek biologicznych w rozpuszczalniku H_2O/D_2O .



Rysunek 7 Sekwencja DOSY z echem stymulowanym

Przykładową sekwencję DOSY przedstawiono na rysunku 7. Jest to sekwencja echa stymulowanego uzupełniona impulsowym gradientem pola magnetycznego, którą zastosowano w ramach niniejszej pracy. W sekwencji można wyróżnić trzy impulsy RF o długości $\pi/2$, które to są odpowiedzialne za formowanie echa stymulowanego. Między pierwszym i drugim impulsem, i po trzecim impulsie RF przykładane są impulsy δ gradientu pola magnetycznego G_z . Obecność impulsów δ jest kluczowa w eksperymentach DOSY. Powtarzając powyższą sekwencję z różnymi wartościami gradientu G_z impulsów gradientowych δ i rejestrując każdorazowo sygnał echa stymulowanego, dysponuje się danymi niezbędnymi do obliczenia widm dużej zdolności rozdzielczej ważonych dyfuzją i zaprezentowania ich w formie widma 2D.

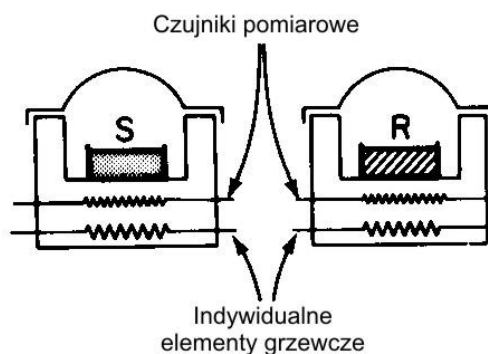
4.2 Różnicowa kalorymetria skaningowa

Dynamiczna kalorymetria skaningowa (ang. *differential scanning calorimetry* – DSC) jest jedną z powszechnie stosowanych metod analizy termicznej, wykorzystywaną do badania efektów cieplnych, które towarzyszą przemianom fazowym (np. topnienie, krystalizacja, przemiany polimorficzne). Przy pomocy kalorymetrii DSC można zarejestrować przemiany strukturalne materiału, nawet wtedy gdy nie ma wizualnych dowodów, że taka przemiana nastąpiła [108].

W przypadku polimerów metoda DSC jest najczęściej stosowana do wyznaczania temperatury topnienia T_m i temperatury zeszklenia T_g [109]. Obecnie najczęściej stosowane są dwa typy systemów DSC, które różnią się od siebie rozwiązaniami konstrukcyjnymi związanymi ze stosowanymi metodami pomiaru. W pierwszym z nich wykorzystuje się metodę kompensacji mocy (ang. *power compensation*), a w drugim metodę przepływu strumienia ciepła (ang. *heat flux*). Różnice pomiędzy kalorymetrami obydwu typów dotyczą czułości, poziomu szumów, zakresu mierzalnych efektów energetycznych oraz dopuszczalnej masy próbek.

4.2.1 Metoda kompensacji mocy

Działanie kalorymetru DSC, który zastosowano w badaniach przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy, opiera się na zasadzie kompensacji mocy. W takim układzie temperatury próbki badanej i odniesienia kontrolowane są za pomocą dwóch, niezależnych od siebie, lecz identycznych pieców (Rysunek 8).



Rysunek 8 Schemat komory pomiarowej kalorymetru DSC wykorzystującego metodę kompensacji mocy, S – próbka badana, R – próbka odniesienia [110]

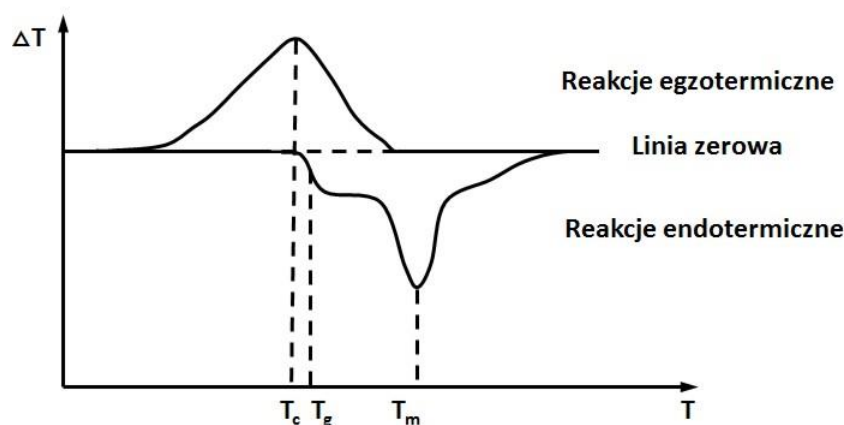
Każdy z pieców jest sterowany niezależnie, tak aby w trakcie pomiaru temperatury próbki badanej i odniesienia w trakcie pomiaru były jednakowe (różnica temperatur $\Delta T = 0$). Wówczas gdy badany materiał podlega przemianie, niezbędne jest dostarczenie/odebranie dodatkowej porcji energii w celu zniwelowania różnicy temperatur pomiędzy badaną próbką i próbką odniesienia. Energia ta jest równa zmianie entalpii lub pojemności cieplnej badanego układu i jest ona proporcjonalna do ilości ciepła ΔQ przekazanego do układu lub pobranego przez ten układ [110].

4.2.2 Zastosowanie metody DSC

Pomiary z zastosowaniem kalorymetru DSC, niezależnie od użytej metody pomiarowej, wykonuje się podobnie. Dwa naczynka: z próbką i wzorcowe, umieszczone są w zamkniętej komorze kalorymetru. Pomiary wykonuje się zgodnie z ustalonym wcześniej programem temperaturowym, a obydwa naczynka (kapsułki) są utrzymywane w jednakowej temperaturze. Próbka odniesienia musi być stabilna termicznie w analizowanym zakresie temperatur, dlatego też najczęściej stosuje się w tym celu puste naczynko. Termogram otrzymany w wyniku pomiaru pokazuje zależność strumienia ciepła, dostarczonego w celu zniwelowania różnicy temperatur powstającej między próbkami, od temperatury. Ciepło przemiany można wyznaczyć na podstawie analizy piku, który odzwierciedla efekt cieplny zarejestrowanego procesu.

Gdy badany układ podlega przemianie egzotermicznej (np. krystalizacji), wówczas emituje on nadmiarowe ciepło wytworzone w trakcie przebiegu tego procesu, zatem układ taki traci energię, a jego całkowita energia wewnętrzna maleje ($\Delta U < 0$). Wydzielające się dodatkowe ciepło przyczynia się do ogrzania próbki (dodatnia różnica temperatur między

próbką i wzorcem $\Delta T > 0$), co na termogramie (Rysunek 9) jest odzwierciedlone w postaci dodatniego odchylenia od linii zerowej [111]. Z kolei reakcje endotermiczne (np. topnienie fazy krystalicznej) związane są z pochłanianiem ciepła (układ uzyskuje energię), w związku z tym całkowita energia wewnętrzna układu wzrasta ($\Delta U > 0$). W przypadku reakcji endotermicznych część dostarczanego ciepła zostaje zużyta w tej przemianie (ujemna różnica temperatur między próbką i wzorcem $\Delta T < 0$), wskutek czego niezbędne jest dostarczenie dodatkowej porcji ciepła, co na wykresie uwidacznia się w postaci ujemnego odchylenia od linii zerowej [111].



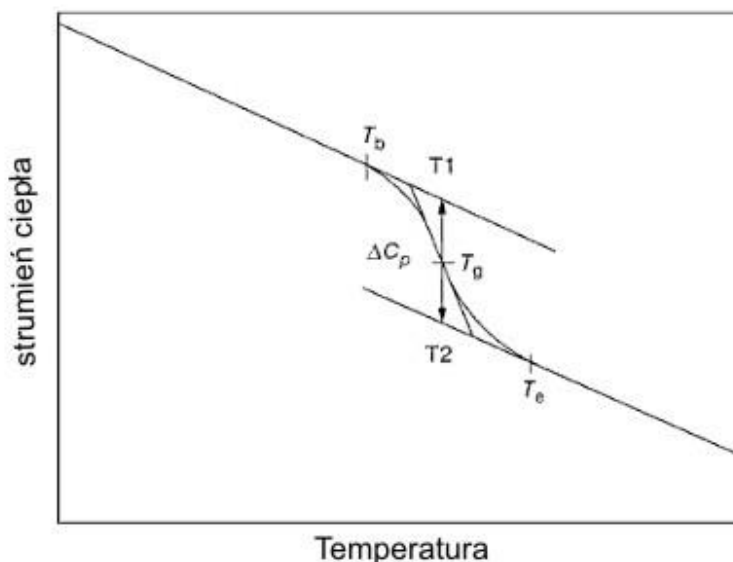
Rysunek 9 Zmiany różnicy temperatur $\Delta T = f(T)$ dla reakcji egzo i endotermicznych [111]

Zmianę entalpii układu w przedziale temperatur, w którym zachodzi przemiana (zarówno dla procesu egzotermicznego, jak i endotermicznego), można określić wyznaczając powierzchnię pod (lub nad) pikiem zarejestrowanym na termogramie DSC.

$$\Delta H = H_2 - H_1 = \int_{T_1}^{T_2} c_p dT \quad (3)$$

Kolejnym parametrem, który można wyznaczyć na podstawie analizy termogramu DSC, jest temperatura przejścia szklanego. W miarę obniżania temperatury ciekły polimer kurczy się, a jego lepkość wzrasta. Po osiągnięciu temperatury krystalizacji polimery zdolne do krystalizacji przechodzą w częściowo krystaliczne ciało stałe. Jednakże przy odpowiednio szybkim chłodzeniu krystalizacja nie zdąży nastąpić i ciecz ulegnie przechłodzeniu, a dalsze ochładzanie powoduje wzrost lepkości cieczy i układ staje się sztywnym ciałem stałym charakteryzującym się brakiem uporządkowanie dalekiego zasięgu. Temperatura, w której zachodzi takie przejście, zwane przejściem szklanym, jest zależna od tempa grzania/chłodzenia, jak również innych parametrów eksperymentu. Stopiony polimer stopniowo nabiera właściwości ciała szklanego, a zakres temperatur

w którym zachodzi taka przemiana obejmuje od 20°C do 40°C. Typową zależność strumienia ciepłego od temperatury, odzwierciedlającą zmiany pojemności cieplnej ΔC_p , która zachodzi w trakcie przejścia ze stanu szklistego do stanu lepkosprężystego, przedstawiono na rysunku 10.



Rysunek 10 Proces dewitryfikacji, zachodzący w trakcie grzania próbki, z wyraźnie uwidocznionym przejściem szklistym [111]

Temperaturę przejścia szklistego T_g określa się, jako wartość średnią temperatur T_1 i T_2 . Wartości T_1 i T_2 wyznacza się jako temperatury, w których prosta styczna do wykresu zależności strumienia ciepła ϕ od temperatury T w pobliżu przejścia szklistego, przecina dwie równoległe do siebie proste, z których jedna jest styczna do zależności $\phi(T)$ przed, a druga po przejściu próbki w stan lepkosprężysty.

4.3 Techniki mikroskopowe

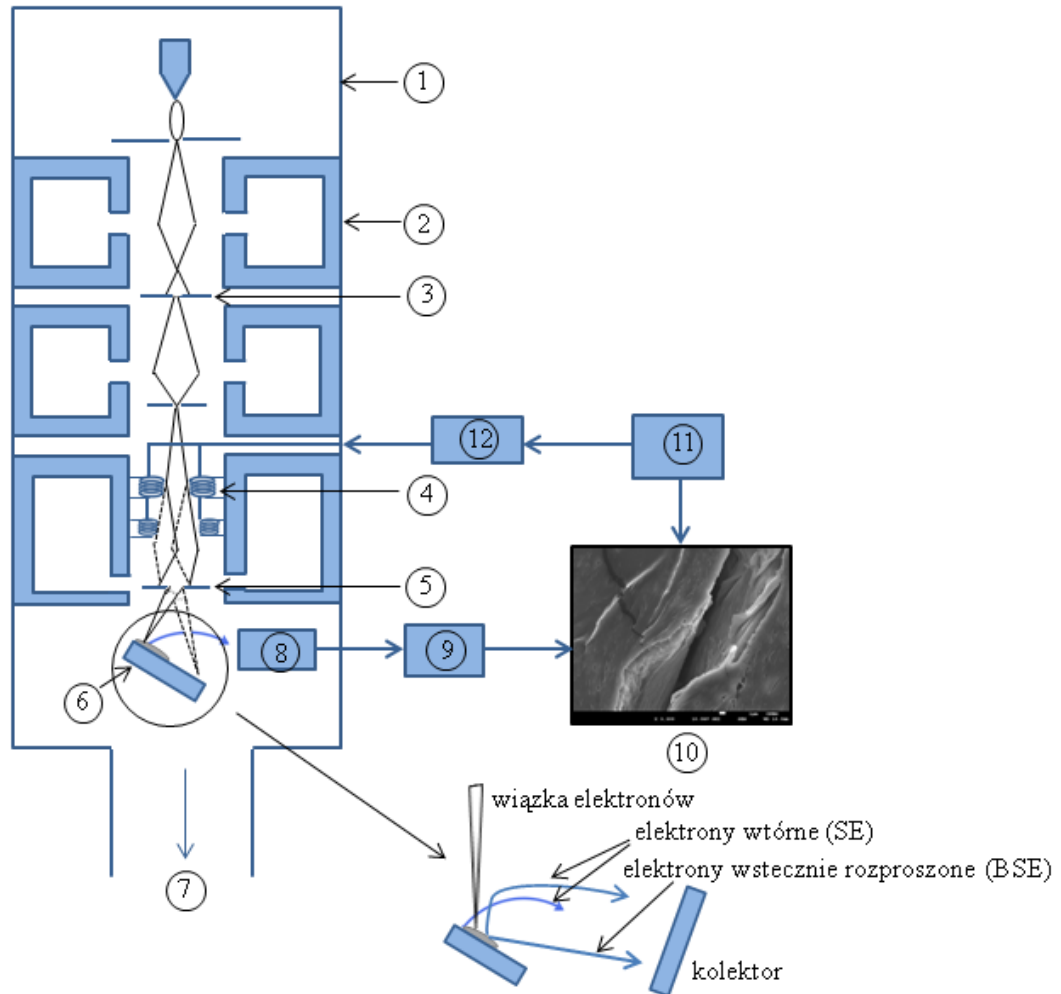
4.3.1 Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM)

Jedną z najbardziej uniwersalnych metod mikroskopowych, która jest szeroko stosowana w badaniach strukturalnych, jest skaningowa mikroskopia elektronowa (ang. SEM – scanning electron microscopy). Zastosowanie tej metody umożliwia uzyskanie obrazów o wysokiej rozdzielczości pozwalające na obserwację i analizę struktury powierzchni różnego typu materiałów organicznych, jak i nieorganicznych [112]. W mikroskopii SEM wykorzystywane są dwie podstawowe metody uzyskiwania obrazu. W ramach pierwszej z nich skanuje się próbkę punkt po punkcie, a następnie tak utworzone obrazy są składane

i uzyskuje się obraz całości. Stosując drugą metodę, oświetla się wszystkie punkty obserwowanego obiektu i po oświetleniu preparatu przez wiązkę promieniowania tworzony jest pełen obraz. Metoda ta uzyskała szerokie zastosowanie ze względu na wszechstronność zastosowania oraz prostotę przygotowania próbki do obrazowania. Jedynym warunkiem jest to, że badana próbka musi być odporna na wysychanie i wysoką próżnię. Próbka powinna być również przewodząca, jednakże obecnie nie stanowi to problemu, gdyż w tym celu materiały nieprzewodzące można pokryć powłokami przewodzącymi.

4.3.1.1 Budowa i zasada działania SEM

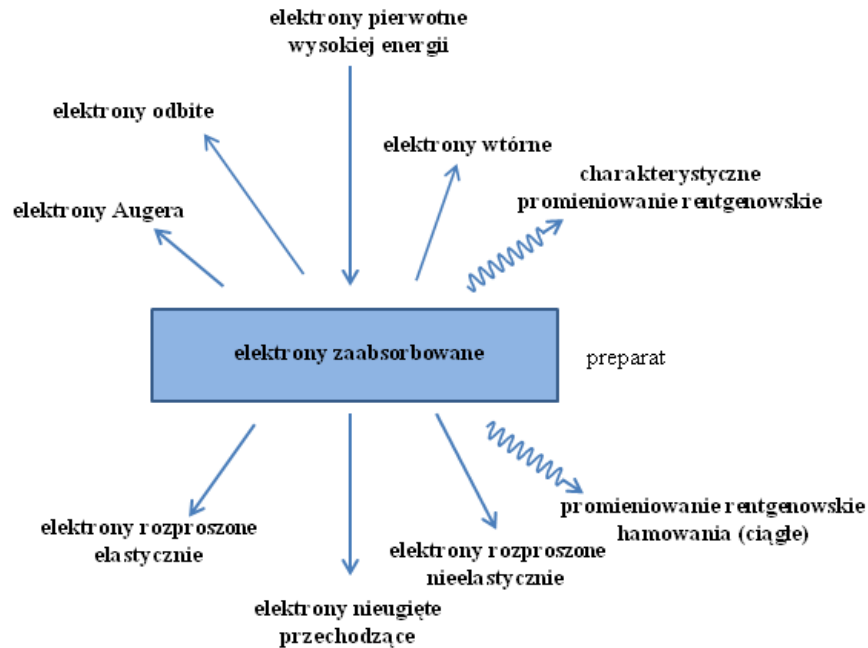
Pierwszy obraz SEM uzyskał niemiecki elektrotechnik Max Knoll (1897–1969) w roku 1935 [113]. Dwoma podstawowymi elementami budowy mikroskopu SEM są: kolumna elektronowa, w której znajduje się działo elektronowe oraz kontrola sterowania (Rysunek 11). Próbka umieszczona jest w komorze, w której wytwarzana jest próżnia rzędu około 10^{-4} Pa. Działo elektronowe, zbudowane zazwyczaj z włókna wolframowego lub LaB_6 , generuje i przyspiesza elektrony, nadając im energię w zakresie od 0.1 do 30 keV. Następnie wiązka elektronów, która przemieszcza się w próżni wzdłuż rury elektronowej, jest formowana przez znajdujące się w kolumnie soczewki elektronowe. Soczewki umieszczone odpowiednio na górze i na dole kolumny nazywa się odpowiednio soczewką kondensatora i soczewką obiektywową. Mają one za zadanie ogniskować wiązkę elektronów, zmniejszając jej średnicę, tak aby końcowa średnica wiązki miała rozmiar 2 – 10 nm. Mikroskop wyposażony jest również w dwie pary cewek elektromagnetycznych, zwanych skanującymi, za pomocą których wiązka może być przemieszczana przez całą próbkę. Pierwsza para cewek odchyła wiązkę od osi mikroskopu, a druga para zagina wiązkę z powrotem na tę oś. Sygnał z powierzchni próbki dociera do detektora, którego istotną część stanowią scyntylator i fotopowielacz. Zjawisko scyntylacji umożliwia przekształcenie energii elektronów na impulsy świetlne, które są wzmacniane przez fotopowielacz. Zebraną informację obserwuje się w postaci obrazu na ekranie komputera. Działanie całego mikroskopu kontrolowane jest z pulpitu operatora poprzez dobór parametrów wiązki.



Rysunek 11. Schemat budowy kolumny elektronowej; (1) działo elektronowe, (2) soczewka elektronowa (kondensora), (3) Spray apertury, (4) cewki skanujące, (5) apertura końcowej soczewki, (6) próbka, (7) pompa próżniowa, (8) detektor, (9) wzmacniacz, (10) obraz na ekranie, kineskop (11) generator skanowania, (12) kontrola powiększenia obrazu

U podstaw zasady działania mikroskopu elektronowego leży oddziaływanie wiązki elektronów z materiałem. Elektrony wiązki zderzają się z atomami próbki, czemu mogą towarzyszyć następujące efekty: absorpcja elektronów, emisja promieniowania, odbicie elektronów od materiału lub ich przenikanie. W przypadku, gdy wiązka elektronów uderzy w powierzchnię analizowanej próbki, to wskutek tego następuje emisja elektronów wybijanych z atomów tej próbki. Można przy tym wyróżnić m.in. elektrony wtórne (SE), elektrony rozproszone wstecznie (BSE) oraz ponadto towarzyszące oddziaływaniu elektronów z materiałem charakterystyczne promieniowanie rentgenowskie (Rysunek 12). Elektrony te mogą zostać zarejestrowane i przetworzone na różnego typu sygnały, które zależnie od ich energii mogą być wykorzystane do generowania obrazu powierzchni

badanej próbki (w celu określenia topografii), jak również służyć do badania właściwości badanego materiału (np. struktury krystalograficznej i kompozycji) [114].

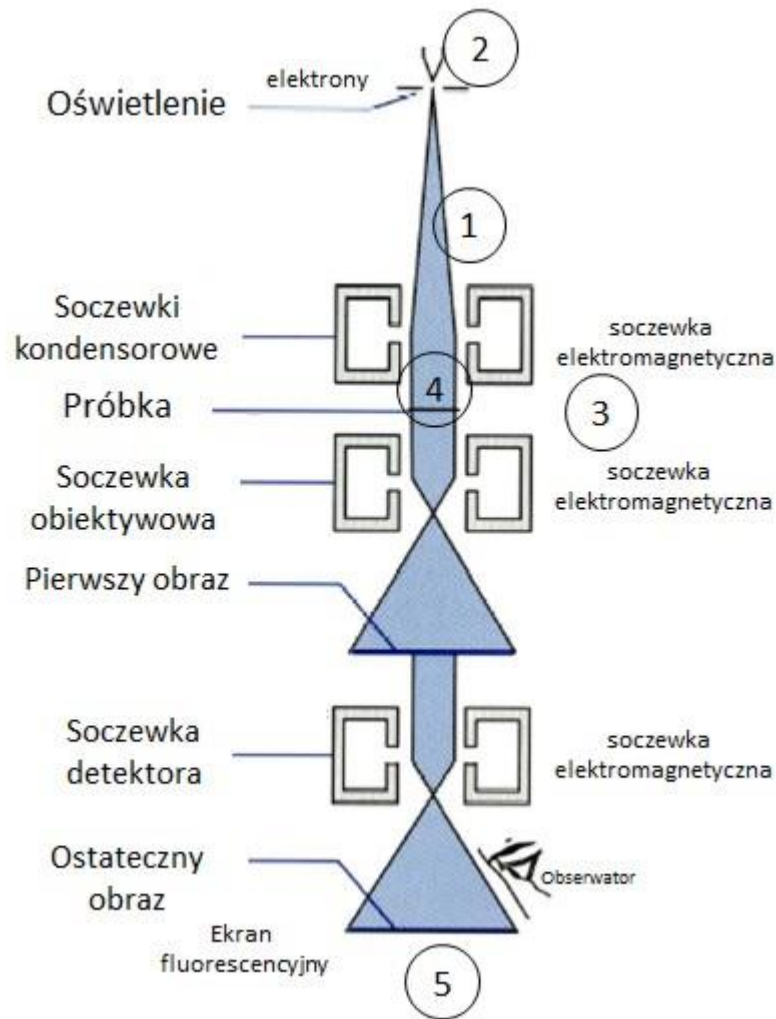


Rysunek 12 Efekty oddziaływania elektronów z ciałem stałym

4.3.2 Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM)

Transmisyjna mikroskopia elektronowa (ang. TEM – Transmission Electron Microscopy) jest jedną z metod szeroko stosowanych do obserwacji struktury układów polimerowych. Pierwszy mikroskop elektronowy został skonstruowany przez Ernsta Ruska, niemieckiego fizyka w roku 1931 [115].

Jednym z głównych elementów transmisyjnego mikroskopu elektronowego (Rysunek 13) jest kolumna mikroskopu (1), zawierająca działło elektronowe (2), które wytwarza (np. w wyniku termoemisji lub emisji polowej) wiązkę elektronów. Wstępnie uformowana wiązka elektronów (pomiędzy katodą i anodą) zostaje przyspieszona, a każdy z elektronów uzyskuje energię: $E = eU$, gdzie e jest ładunkiem elektronu, a U napięciem panującym między katodą i anodą.



Rysunek 13 Budowa TEM

Zwiększenie napięcia pozwala na zwiększenie pędu elektronów, co prowadzi do zmniejszenia długości fali de Broglie'a. Utrzymywanie w kolumnie bardzo wysokiej próżni jest konieczne, aby elektrony mogły przebyć drogę od działła elektronowego do ekranu. Ponadto wiązka elektronów jest ogniskowana przy użyciu soczewek magnetycznych, których działanie opiera się na odpowiednim ukształtowaniu pola magnetycznego wytwarzanego przez prąd płynący w cewkach (3). Dużą zaletą soczewek magnetycznych jest możliwość płynnej zmiany ich ogniskowych przez regulację natężenia prądu.

W transmisyjnych mikroskopach elektronowych stosuje się dostatecznie cienkie preparaty, dzięki czemu część elektronów padających przechodzi przez badaną próbkę (4). Wiązka elektronowa po przejściu przez preparat jest kształtowana z wykorzystaniem układu obiektyw – okular, w których w celu zmiany biegu naładowanych cząstek wykorzystywane są również soczewki magnetyczne. Gdy mikroskop pracuje w trybie

obrazu, wówczas wiązka tworzy obraz preparatu na detektorze (5), natomiast gdy mikroskop pracuje w trybie dyfrakcji, to obraz tworzony jest dzięki elektronom podlegającym dyfrakcji na strukturze próbki. Detektory mają najczęściej postać matrycy CCD, która w wyniku pobudzenia elektronami wytwarza zapisywane przez odpowiednią aparaturę pomiarową sygnały elektryczne, służące do utworzenia obrazu próbki.

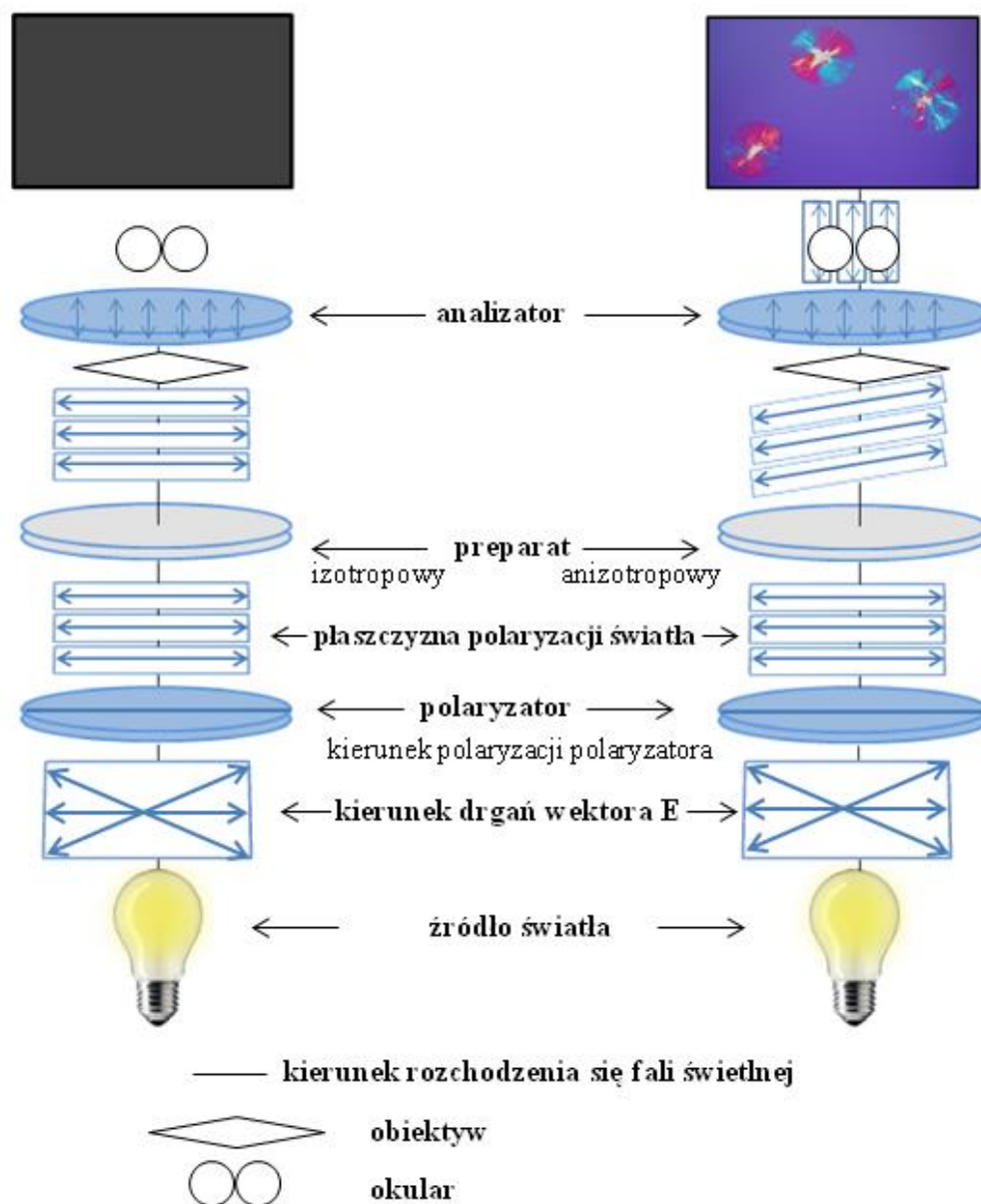
Elektrony padające na preparat mogą wzbudzać elektrony z atomów badanej próbki, które następnie emitują charakterystyczne dla nich promieniowanie rentgenowskie. Efekt ten jest wykorzystywany w celu analizy składu chemicznego próbki w tych mikroskopach elektronowych, które wyposażone są w spektrometr EDS (ang. Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy) lub WDS (ang. Wavelength Dispersive X-Ray Spectrometry).

4.3.3 Polaryzacyjna Mikroskopia Optyczna (POM)

Pierwszy mikroskop polaryzacyjny skonstruowany został przez W.H.F. Talbota około 1834 roku [112]. Mikroskopia polaryzacyjna jest metodą badania mikrostruktury obiektów, która wykorzystuje interakcje materiału ze światłem spolaryzowanym. Metodę tę stosuje się do badań materiałów dwójłomnych, które wykazują anizotropowe właściwości optyczne. Rozszczepiają one przechodzące przez nie światło na dwie spolaryzowane fale, które drgają w płaszczyznach wzajemnie prostopadłych. Fale te mają różne prędkości (v_1 i v_2) oraz współczynniki załamania (n_1 i n_2). Różnica pomiędzy tymi współczynnikami załamania $\Delta n = n_1 - n_2$ jest miarą dwójłomności materiału. Mikroskop polaryzacyjny stosowany jest m.in. do badania: skał, minerałów, kruszców, preparatów biologicznych, struktury komórek i tkanek, w metalografii, w przemyśle szklarskim i włókienniczym. Zastosowanie znalazł również w badaniu ciekłych kryształów.

4.3.3.1 Budowa i zasada działania polaryzacyjnego mikroskopu optycznego

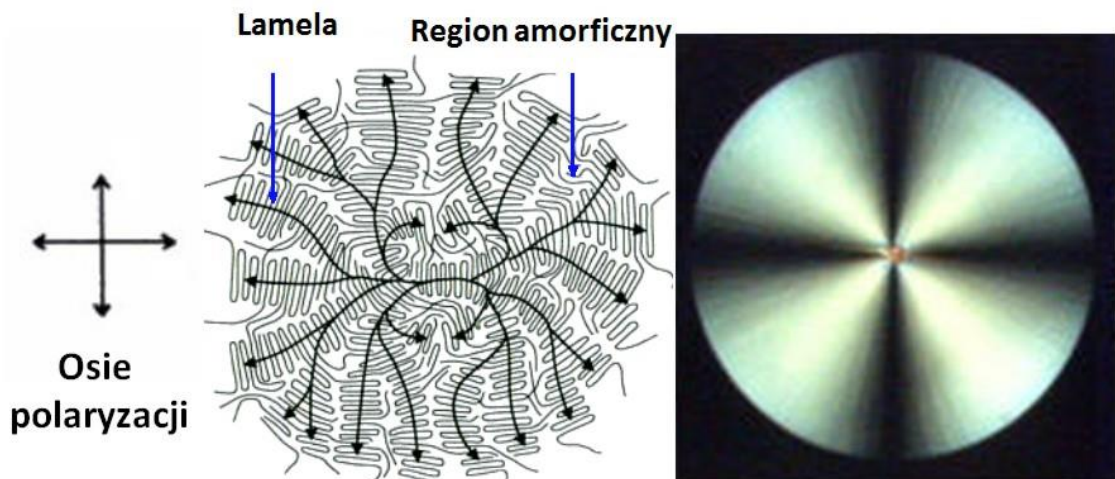
Polaryzacyjny mikroskop optyczny zawiera wszystkie podstawowe elementy standardowego, transmisyjnego mikroskopu optycznego, jednak wyposażony jest dodatkowo w obrotowy stolik i dwa filtry polaryzacyjne (polaryzatory) umiejscowione między okulem i źródłem światła. Pierwszy polaryzator znajduje się między źródłem światła i analizowaną próbką, a drugi (zwany analizatorem) umieszczony jest między próbką a tubusem (Rysunek 14). Obydwa filtry mają możliwość obrotu i są polarne tzn. selektywnie przepuszczają światło spolaryzowane w jednej konkretnej płaszczyźnie [112, 116].



Rysunek 14 Zasada działania mikroskopu polaryzacyjnego: transmisja światła przez preparat (izotropowy i anizotropowy) umieszczony między skrzyżowanymi polaryzatorem i analizatorem

Najczęściej stosuje się polaryzatory skrzyżowane tzn. w trakcie obserwacji płaszczyzny polaryzacji polaryzatora i analizatora są ustawione względem siebie prostopadle (są skręcone o 90°), co powoduje, że analizator nie przepuszcza światła, które przeszło przez polaryzator. W takim przypadku, jeżeli w polu obserwacji nie znajduje się próbka lub badany materiał jest izotropowy, wtedy pozostaje ono ciemne, gdyż światło po przejściu przez taki ośrodek, który nie powoduje skręcenia polaryzacji światła, dociera do analizatora spolaryzowane prostopadle do jego płaszczyzny polaryzacji. Jeśli próbka jest

dwójłonna (anizotropowa) to wtedy płaszczyzna polaryzacji światła po przejściu przez próbkę ulega skręceniu i przynajmniej część światła przechodzi przez analizator i obraz dociera do oka obserwatora. Towarzyszą temu zazwyczaj efekty barwne ze względu na to, że zmiana stanu polaryzacji jest różna dla różnych długości światła. Poprzez obrót analizatora można zmieniać kąt pomiędzy płaszczyzną polaryzacji analizatora i polaryzatora, co pozwala uzyskać wygaszenie jednych obszarów i wyeksponowanie (rozjaśnienie) innych. W trakcie obserwacji próbka jest obracana na stoliku rotacyjnym mikroskopu i wówczas przechodzi przez cztery pozycje odpowiadające wygaszeniu światła (minimum intensywności) oraz cztery pozycje odpowiadające maksimum jego intensywności. W pozycji wygaszenia, wyróżniony kierunek próbki (w przypadku polimerów równoległy do długiej osi makromolekuły) jest zorientowany równoległe lub prostopadłe do kierunku polaryzacji. W związku z charakterystyczną budową sferolitów, w których lamelle układają się promieniście względem ich środków, w świetle spolaryzowanym uzyskuje się dla nich charakterystyczny obraz krzyża maltańskiego. Można to wytłumaczyć następująco – maksymalną intensywność obrazu uzyskuje się wtedy gdy lamelle utworzone przez łańcuchy (Rysunek 15) ułożone są pod kątem 45° względem płaszczyzny polaryzacji światła, co uwidacznia się w postaci wzmocnienia i rozjaśnienia obrazu, natomiast efekt wygaszenia (zaciemnienie) obserwowany jest dla kątów 0° lub 90° .



Rysunek 15 Schemat ilustrujący powstawanie obrazu krzyża maltańskiego w wyniku przejścia światła spolaryzowanego przez sferolit

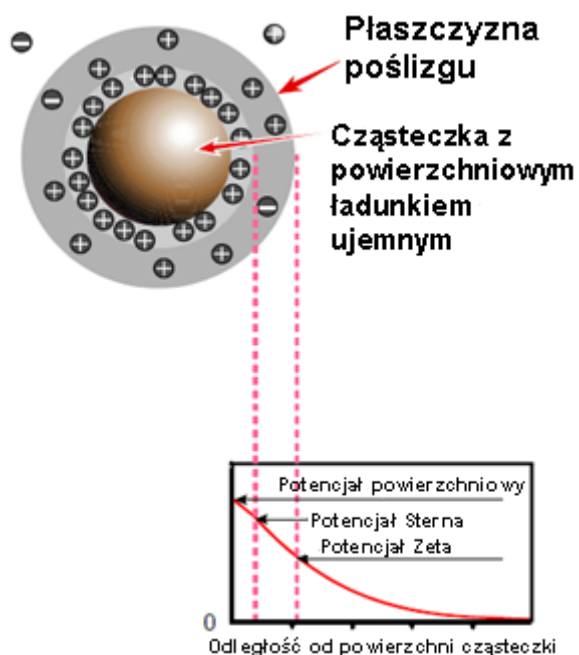
4.4 Dynamiczne rozpraszanie światła i potencjał zeta

Dynamiczne rozpraszanie światła (ang. dynamic light scattering, DLS) jest metodą, którą często stosuje się do analizy średnich rozmiarów cząstek polimerowych, DNA, niewirusowych nośników, jak również całych kompleksów oraz pomiaru ich rozkładu wielkości. Metodą tą można mierzyć współczynniki dyfuzji, współczynniki aktywności, stałe szybkości reakcji chemicznych itp. [117]. Technika ta wykorzystuje pomiar fluktuacji strumienia fotonów rozproszonych przez badaną substancję do opisu dyfuzji cząstek (ruchów Browna). Uzyskane dane są punktem wyjścia do wyznaczenia rozmiaru makrocząsteczek w roztworze. Gdy obserwowany jest ograniczony obszar wtedy dyfuzja cząstek w tym obszarze staje się źródłem czasowych fluktuacji natężenia światła rozproszonego, których to szybkość jest wyznaczana przez dyfuzję tych cząsteczek. W celu zanalizowania otrzymanych danych stosuje się funkcję korelacji i jej właściwości, a wyznaczone parametry tej funkcji pozwalają na określenie wielkości cząsteczek i ich współczynników dyfuzji [118]. Rozmiary badanych cząsteczek można wyznaczyć za pomocą przedstawionego poniżej równania Stokesa-Einsteina, opisującego zależność pomiędzy rozmiarem kulistych cząstek a szybkością ich ruchów Browna, której miarą jest współczynnik dyfuzji translacyjnej D .

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r} \quad (4)$$

gdzie: k – stała Boltzmana, T – temperatura, η – lepkość, r – hydrodynamiczny promień molekuly.

W przypadku większości obecnie używanych spektrometrów DLS możliwy jest jednoczesny pomiar rozmiarów cząsteczek z zastosowaniem dynamicznego rozpraszania światła oraz potencjału zeta. Potencjał zeta (ang. ζ -potential) jest to potencjał, który powstaje na granicy między warstwą dyfuzyjną a warstwą Sterna, która to pojawia się wokół powierzchni naładowanych cząstek w roztworze (Rysunek 16). Do jego wyznaczenia wykorzystuje się pomiar prędkości cząstek w polu elektrycznym z zastosowaniem efektu Dopplera. Pomiar potencjału zeta ma na celu sprawdzenie czy badane nanocząsteczki będą w stanie skompleksować i przenieść do komórek ujemnie naładowany kwas nukleinowy. Polimery o ujemnym potencjale zeta nie wykazują transfekcji w przeciwieństwie do polimerów wykazujących dodatnią wartość tego potencjału.



Rysunek 16 Schematyczne przedstawienie płaszczyzn występujących w roztworze, istotnych w pomiarach potencjału Zeta

4.5 Chromatografia żelowa i gazowa

Chromatografia żelowa jest techniką analityczną służącą do rozdzielania lub badania składu mieszanin związków chemicznych. Została ona wynaleziona przez Michała Cwieta, uznawanego za twórcę chromatografii [119], który to pierwsze prace prowadził używając roztworu chlorofilu w eterze naftowym, przesączając go przez ubitą kredę. Obecnie chromatografia jest szeroko stosowana dzięki rozwojowi technologii wypełnień i kolumn, miniaturyzacji, automatyzacji oraz zastosowaniu nowych, selektywnych układów detekcyjnych.

Chromatografia wykluczania (ang. Size-Exclusion Chromatography (SEC)), zwana również chromatografią żelową (ang. Gel Permeation Chromatography (GPC)), jest techniką, która ma zastosowanie głównie w analizie związków wielkocząsteczkowych. Wypełnienia stosowane w chromatografii składają się z małych (ok. 5 – 10 mikrometrów) ziaren krzemionki lub polimerów, zawierających sieć jednolitych porów do których wnętrza dyfundują cząstki eluentu (fazy nośnej) i cząstki badane. Molekuły zostają „uwięzione” w porach wypełniacza, a następnie są z nich usuwane na skutek przepływu eluentu przez kolumnę. Średni czas przebywania cząsteczek w porach zależy od ich wielkości. Jeśli dana cząstka jest większa niż średnice porów danej kolumny, nie jest obserwowany żaden czas retencji (przebywania w kolumnie) i taka cząstka pojawia się

jako pierwsza. Cząsteczki o mniejszych średnicach przepływają przez kanaliki wypełnienia, przez co przebywają w kolumnie dłużej. Na podstawie wyznaczonego czasu retencji można określić wielkość cząsteczek. Ważnym jest, iż w chromatografii wykluczania nie zachodzą żadne chemiczne ani fizyczne oddziaływania pomiędzy fazą stacjonarną i badanymi substancjami.

Chromatografia żelowa najczęściej przeprowadzana jest w dwóch wariantach: 1) w warunkach niewodnych, gdy eluentem jest np. tetrahydrofuran (THF), dioxan, czterochloroetylen, chlorobenzen, ksylen i służy do badań masy cząsteczkowej polimerów nisko i średnio polarnych, rozpuszczalnych w rozpuszczalnikach niepolarnych, a także lipidów, fosfolipidów itp., oraz 2) w warunkach wodnych, gdy eluentem może być dimetyloformamid, metanol, acetonitryl i ich mieszaniny z wodą, służącą do rozdzielania, a także do charakteryzowania masy cząsteczkowej polimerów polarnych, a szczególnie biopolimerów takich jak polisacharydy, białka oraz nukleotydy.

Dzięki metodzie SEC można określić masy cząsteczkowe polimerów, które są w przybliżeniu proporcjonalne do ich promieni hydrodynamicznych. Można tego dokonać tym dokładniej im bardziej cząsteczki badanego polimeru są zbliżone budową i kształtem do tego polimeru, który został wykorzystany do kalibracji. Do kalibracji wykorzystuje się odpowiednie polimery wzorcowe o małej polidispersyjności. Najczęściej stosowanym wzorcem do określenia masy cząsteczkowej polimerów średnio polarnych, jest polistyren o współczynniku polidispersyjności z zakresu od 1.05 do 1.2. W badaniach dokładnych stosowane są wzorce tego samego typu co badany polimer.

Najczęściej stosowanymi detektorami są: detektor refraktometryczny (RI), UV i lepkościowy. W tych detektorach sygnał jest proporcjonalny (lub w przybliżeniu proporcjonalny), nie tylko do stężenia badanych składników, ale także do masy cząsteczkowej. Niestety detektory te wykazują stosunkowo niską czułość, co nie jest wadą, gdyż stężenia próbek dozowane do kolumny chromatograficznej są wysokie, jednakże coraz większym zainteresowaniem cieszą się detektory wykorzystujące wiązkę światła laserowego. Takim detektorem jest np. detektor MALLS (ang. Multi-Angle Laser Light Scattering). Wykorzystuje on zjawisko rozproszenia, mierząc intensywność rozproszenia wiązki światła laserowego przez cząsteczki o różnych promieniach hydrodynamicznych, pod różnymi kątami. Na podstawie sygnałów otrzymanych z tego detektora można bezpośrednio, bez stosowania kalibracji opartej o wzorce, obliczyć rozkład masy cząsteczkowej polimeru, gdy wynosi ona ponad 5 tysięcy daltonów. Jest to możliwe dzięki odpowiedniemu oprogramowaniu, wykonującemu obliczenia w oparciu o zasady fizyki

rozproszenia i ugięcia promieni świetlnych przez cząsteczki o wymiarach zbliżonych do długości fali lasera użytego w detektorze.

Chromatografia gazowa (GC) działa na podobnej zasadzie jak chromatografia żelowa, z tym że w przypadku GC fazą ruchomą jest gaz (najczęściej hel, argon, azot wysokiej czystości, coraz rzadziej wodór), a fazą stacjonarną adsorbent lub absorbent pokrywający nośnik (wypełnienie kolumny lub jej ścianki). Technika GC umożliwia ustalenie procentowego składu mieszanin związków chemicznych, w których występuje ich nawet kilkaset. Stosując klasyczną detekcję można dokonać orientacyjnej identyfikacji składników mieszaniny na podstawie ich czasów retencji. Niemal jednoznaczną identyfikację umożliwia użycie spektrometru mas jako detektora (ang. gas chromatography – mass spectrometry, GC–MS). Zaletą chromatografii gazowej jest możliwość użycia bardzo niewielkiej ilości analizowanej substancji (od 0.01 µl do 100 µl).

4.6 Badania biologiczne

4.6.1 Cytotoksyczność

Obecnie istnieje wiele testów, za pomocą których można określić czy dany polimer (związek chemiczny) jest toksyczny dla organizmów żywych (komórek ludzkich lub zwierzęcych) [120 – 121]. Mogą to być próby oparte na metodach kolorymetrycznych, fluorymetrycznych lub bioluminescencyjnych. Testy cytotoksyczności umożliwiają badanie zmiany żywotności komórek w warunkach *in vitro* wskutek działania na nie związków chemicznych, których toksyczność została poddana próbie. Substancje te (np. polimery) mogą oddziaływać na funkcje biologiczne komórki, zaburzając jej procesy fizjologiczne. Pomiar parametrów komórkowych, odzwierciedlających zmiany tych procesów, które zachodzą w komórce pod wpływem toksycznych związków, pozwala na obserwację zmiany liczby żywych komórek, stopnia integralności błony komórkowej, aktywności enzymatycznej związanej z metabolizmem komórki oraz zdolności do podziałów komórkowych (stopnia proliferacji). Wyniki badań toksyczności analizowanych materiałów są korelowane z próbką kontrolną, którą stanowią komórki poddane stymulacji z użyciem rozpuszczalnika stosowanego do przygotowania badanych preparatów [122]. Na podstawie oceny różnic żywotności komórek testowanych i kontrolnych można określić czy dana substancja jest toksyczna dla komórek.

Spośród technik kolorymetrycznych jednym z najbardziej popularnych i szeroko stosowanym jest test MTT opracowany w latach 80-tych XX wieku przez Mosmanna

i innych [123]. Już w 1956 roku został opublikowany pierwszy dokument na temat stosowania soli tetrazolu jako wskaźnika żywotności komórek. Stosowanie wyżej wymienionego testu opiera się na fakcie, że żywe komórki są zdolne do redukcji nieznacznie zabarwionych lub bezbarwnych soli tetrazolu do intensywnie zabarwionych pochodnych formazanu. Dlatego w teście istotnym procesem jest dezaktywacja mitochondriów, które są inaktywowane w ciągu kilku minut po śmierci komórki. Produkują one bowiem dehydrogenazę bursztynianową – enzym mitochondrialny obecny w żywych komórkach, który przekształca rozpuszczalną sól tetrazoliową, o żółtym zabarwieniu (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)- 2,5-difenyloctetrazoliowy), w formę zredukowaną, nierozpuszczalny formazan, wytrącający się w postaci kryształów [124]. W komórkach uszkodzonych, o upośledzonym metabolizmie lub martwych, formazan tworzy się w mniejszych ilościach lub nie powstaje [121]. Metoda ta stanowi zatem doskonale narzędzie do dyskryminacji żywych i martwych komórek. Początkowo wadą stosowania soli tetrazolu była nierozpuszczalność powstających pochodnych formazanu. Obecnie stosowany jest kwaśny izopropanol, który zmienia środowisko i powoduje rozpuszczenie kryształów formazanu, w wyniku czego powstaje barwny roztwór, którego intensywność zabarwienia mierzona jest spektrofotometrycznie w zakresie długości fal od 492 do 570 nm [124] i jest wprost proporcjonalna do ilości powstałego produktu i pośrednio do liczby żywych komórek [120, 125 – 126]. Zatem zmiany ilości i aktywności enzymatycznej dehydrogenazy bursztynianowej w teście MTT są odzwierciedlone w pomiarach absorbancji roztworu.

4.6.2 Transfekcja

Transfekcja jest to sposób celowego wprowadzania kwasów nukleinowych do komórki. Słowo transfekcja pochodzi od złożenia słów trans- i infekcja. Materiałem genetycznym najczęściej poddawanym procesowi transfekcji jest plazmidowe DNA, małe fragmenty kwasów nukleinowych (siRNA), czy też białka (np. przeciwciała). Termin transfekcji jest często stosowany w odniesieniu do wprowadzania wektorów niewirusowych do komórek eukariotycznych, jednak może także odnosić się do innych metod i typów komórek. Natomiast w przypadku transferu DNA za pośrednictwem wirusów, terminem częściej stosowanym jest transdukcja. Należy mieć świadomość, że transfekcja może spowodować nieoczekiwane zmiany w morfologii i funkcjonalności komórek docelowych.

Transfekcja komórek zwierzęcych wymaga zazwyczaj kontaktu wektora z błoną komórkową albo otwarcia porów lub „dziur” znajdujących się w błonie komórkowej aby

umożliwić pobranie materiału. Istnieją różne metody wprowadzania obcego DNA do komórki. Niektóre z nich polegają na ingerencji fizycznej (elektroporacja, ściskanie komórek, magnetofekcja) lub opierają się na materiałach chemicznych albo biologicznych cząsteczkach (wirusy), które są stosowane jako nośniki.

Elektroporacja polega na przyłożeniu zewnętrznego pola elektrycznego w celu indukcji transfekcji. Jest ona popularnym sposobem, w którym przejściowy wzrost przepuszczalności błony komórkowej uzyskuje się, gdy komórki są wystawione na krótkie impulsy intensywnego pola elektrycznego. Inną metodą jest magnetofekcja, w której to transfekcja komórek zachodzi dzięki zastosowaniu gradientu pola magnetycznego. W tej metodzie wykorzystuje się oddziaływania magnetyczne do dostarczania DNA do komórek docelowych. Kwasy nukleinowe są najpierw wiązane z nanocząstkami magnetycznymi. Następnie przykłada się pole magnetyczne, które stanowi siłę napędową dla kompleksów nanocząsteczek i kwasów nukleinowych, które przemieszczają się w kierunku komórek docelowych i następnie wnikają do nich, po czym ładunek jest uwalniany.

W jednej z najtańszych metod transfekcji stosuje się fosforan wapnia, pierwotnie odkryty przez F.L. Grahama i innych w 1973 roku [127]. Buforowany roztwór soli fizjologicznej zawierającym jony fosforanowe jest połączony z roztworem chlorku wapnia zawierającym DNA do transfekcji. Po połączeniu obu roztworów wytrąca się drobny osad z dodatnio naładowanym wapniem i ujemnie naładowanym fosforanem, wiążący transfekowane DNA na swojej powierzchni. Zawiesinę wraz z osadem dodaje się do hodowli komórkowej. Mechanizm procesu nie jest całkowicie zrozumiały, ale wiadomo, że komórki pobierają część osadu, a wraz z nim DNA.

Kolejną skuteczną metodą transfekcji jest użycie liposomów. Dzięki ich budowie, podobnej do budowy błony komórkowej, mogą się one łączyć z błoną komórkową, uwalniając DNA do komórki. Inną metodą transfekcji jest użycie silnie rozgałęzionych związków organicznych, tzw. dendrymerów. Dodatnio naładowane grupy aminowe, znajdujące się na powierzchni cząsteczki dendrymeru, oddziałują z ujemnie naładowanymi grupami fosforanowymi cząsteczki DNA, co prowadzi do utworzenia kompleksu. Kompleks DNA-dendrymer ma ogólny ładunek dodatni i może wiązać się z ujemnie naładowanymi cząsteczkami powierzchniowymi, znajdującymi się na błonie komórkowej komórek eukariotycznych. DNA jest chronione przed degradacją przez nukleazy endosomalne dzięki silnemu skondensowaniu w kompleksie DNA-dendrymer. Na podobnej zasadzie działają kationowe polimery, takie jak DEAE-dekstran lub polietylenoimina. Ujemnie naładowane DNA wiąże się polikationem, a następnie

kompleks taki jest pobierany przez komórki na drodze endocytozy. Kationowe polimery różnią się od lipidów kationowych tym, że nie zawierają hydrofobowych ugrupowań, dzięki czemu są całkowicie rozpuszczalne w wodzie. Biorąc pod uwagę ich polimerową naturę, polimery kationowe mogą być syntetyzowane w różnych rozmiarach, z różną geometrią (liniowy, rozgałęziony). Każda z metod wyżej wymienionych ma swoje plusy i minusy, jednakże wciąż poszukiwane są nowe metody i materiały mogące znaleźć zastosowanie do transfekcji kwasów nukleinowych.

Badania procesu transfekcji przeprowadza się najczęściej w celu znalezienia nowego środka transfekcyjnego, który będzie bardziej wydajny, mniej cytotoksyczny lub będzie łatwiejszy do zastosowania. Często obiektem wielu badań i testów jest jednak sam proces dostarczania kwasu nukleinowego i obserwacja ekspresji zadanego genu, a pośrednio oznaczanie wydajności transfekcji. Przy wprowadzaniu do użytku nowego nośnika kwasów nukleinowych przeprowadza się badania wydajności transfekcji *in vitro*, aby określić stopień użyteczności danego materiału do celu, w jakim został zaprojektowany. Pierwszym krokiem w określeniu wydajności transfekcji jest wysianie na płytce komórek, do których ma być transfekowany dany kwas nukleinowy. Następnie do naczynia z komórkami dodane są kompleksy składające się z badanego czynnika transfekcyjnego oraz kwasu nukleinowego, po czym komórki są inkubowane z tymi kompleksami przez określony czas. Kolejnym krokiem jest obserwacja i analiza uzyskanych wyników, co wykonuje się przy zastosowaniu mikroskopii lub innych metod, które umożliwiają ocenę powodzenia transfekcji danego genu (np. metody optyczne wykorzystujące ekspresję białka zielonej fluorescencji GFP). Dzięki takim testom można uzyskać wiedzę o wydajności badanego czynnika transfekcyjnego.

5 CHARAKTERYSTYKA BADANYCH MATERIAŁÓW

5.1 Stosowane związki chemiczne

W celu oczyszczenia poli(glikolu etylenowego) (PEGMA, $M_n = 2080$, 50 wg% w wodzie) przeprowadzono ekstrakcję z dichlorometanem. Następnie organiczny roztwór został zmieszany z Na_2SO_4 , w celu usunięcia pozostałej w roztworze wody, przed przepuszczeniem roztworu przez kolumnę z zasadową alumina. Degradowalny czynnik sieciujący (ang. crosslinker), którym był dwusiarczek bis (2-metakryloilo) oksyetylu (DSDMA) został zsyntezowany za pomocą procedury opisanej poniżej (akapit 6.1.1) [128 – 129]. Bromek miedzi I (CuBr , 98%, Acros) został oczyszczony przez trzykrotne zmieszanie z kwasem octowym i przemycie alkoholem etylowym, a następnie suszenie przez 12h w temperaturze 60°C . Metakrylan 2-dimetyloamino etylu (DMAEMA, 97%, Aldrich) został przepuszczony przez zasadową alumina w celu usunięcia inhibitora. Wszystkie inne odczynniki: bromek miedzi II (CuBr_2 , Aldrich), alfa-bromoizomaślan etylu (EBiB, 99%, Aldrich), bromoetan (98%, Aldrich), 1,1,4,7,10,10-hexamethyl triethylenetetramine (HMTETA, 97%, Aldrich), kwas metakrylowy (99%, Aldrich), dwusiarczek bis(2-hydroksy) etylu (BHEDS), N,N-dicykloheksylokarbodiimid (DCC), 4-(dimetyloamino)pirydyna (DMAP) oraz rozpuszczalniki zostały użyte w takiej postaci, w jakiej zostały zakupione, bez dalszego oczyszczania.

5.2 Aparatura pomiarowa i przygotowanie próbek do pomiarów

5.2.1 Chromatografia żelowa (GPC)

Polimery gwiazdziste zostały rozdzielone (oczyszczone) za pomocą chromatografu żelowego wyposażonego w kolumny PSS (ang. Polymer Standards Services) o wielkości ziaren 10^5 , 10^3 i 10^2 Å) z eluentem jakim jest tetrahydrofuran (THF), w temperaturze 35°C , przy szybkości przepływu 1.00 mL/min i detektorem typu differential refractive index (RI) (Waters 2414)). Masa cząsteczkowa (M_n) i polidispersyjność (M_w/M_n) badanych układów zostały określone z zastosowaniem kalibracji opartej na standardzie polistyrenowym, przy użyciu oprogramowania WinGPC 7.0 pochodzącego od PSS. Absolutną masę cząsteczkową ($M_{w,MALLS}$) wyznaczono przy użyciu układu detektorów zawierających detektor RI (Wyatt Technology, Optilab REX), detektor wiskozymetryczny (Wyatt

Technology, ViscoStar) i detektor MALLS (multiangle laser light scattering, Wyatt Technology, DAWN EOS), pracujący z zastosowaniem fali świetlnej o długości 690 nm. Absolutna masa cząsteczkowa została określona za pomocą oprogramowania ASTRA firmy Wyatt Technology.

5.2.2 Dynamiczne rozpraszanie światła (DLS)

Wielkość nanocząstek polimerowych, ich rozkład oraz potencjał zeta zostały określone za pomocą spektrometru do pomiaru dynamicznego rozpraszania światła (wyposażonego w funkcję pomiaru potencjału zeta) – Zetasizer Nano, wyprodukowanego przez Malvern Instruments, Ltd. Potencjał zeta i parametry rozkładu średnic dla każdej próbki wyznaczono na podstawie trzech powtórzeń, przy czym w każdym powtórzeniu wynik uzyskano na podstawie trzech pomiarów.

Technikę DLS zastosowano również do badań degradacji polimerów. W pierwszym etapie przygotowano wodne roztwory gwiazd polimerowych o stężeniu 2 mg/ml, a następnie wykonano pomiary rozpraszania światła, dzięki którym wyznaczono średnicę cząsteczek dla każdej próbki. Następnie sporządzono 100 mM roztwór glutationu, który poddano działaniu azotu przez 20 min. Do fiolek odważono po 8 mg każdego z badanych polimerów, zamknięto je szczelnie za pomocą gumowego korka i przy pomocy igły wpuszczono do każdej z fiolek azot, w celu usunięcia tlenu znajdującego się w fiolce. Do każdej z fiolek, po 20 minutach, przy pomocy strzykawki, wstrzyknięto 4 ml wcześniej przygotowanego glutationu i pozostawiono na 24h w atmosferze azotu. W celu określenia zmian wielkości cząsteczek polimerów zachodzących wskutek degradacji, wykonywano pomiary rozkładu wielkości molekuł z użyciem metody DLS co 24 godziny.

5.2.3 Magnetyczny Rezonans Jądrowy (^1H NMR)

Analiza linii ^1H NMR umożliwiła zweryfikowanie struktury chemicznej zsyntetyzowanych polimerów gwiazdzistych. Rejestrację linii rezonansowych wykonano z wykorzystaniem spektrometru wysokiej zdolności rozdzielczej (High Resolution) firmy Agilent (Rysunek 17) pracującego przy częstotliwości 800 MHz dla protonów. Spektrometr wyposażony jest w magnes nadprzewodzący typu Narrow Bore, wytwarzający pole magnetyczne o indukcji 18.8 T, konsolę pomiarową zbudowaną w technologii cyfrowej DDS2 i szereg głowic pomiarowych dedykowanych do zastosowań specjalistycznych. Widma dużej zdolności rozdzielczej jąder atomów wodoru (protonów) zarejestrowano dla roztworów próbek polimerowych w deuterowanym chloroformie.

Należy wspomnieć, że próbki polimerów uzyskanych w procesie polimeryzacji, przed ich użyciem do badań były poddane oczyszczeniu i osuszeniu. Około 0.5 ml roztworu każdej próbki przelano do szklanych probówek o średnicy 5 mm, standardowo używanych do badań w spektroskopii wysokiej zdolności rozdzielczej, które zamknięto korkiem bez odgazowania substancji. Rejestrację widm przeprowadzono w temperaturze 293 K. Widma protonowe, uzyskane dla badanych układów, omówiono w rozdziale 6.2.1.



Rysunek 17 Spektrometr NMR Agilent 800 MHz

5.2.4 NMR w badaniach procesu dyfuzji translacyjnej makromolekuł

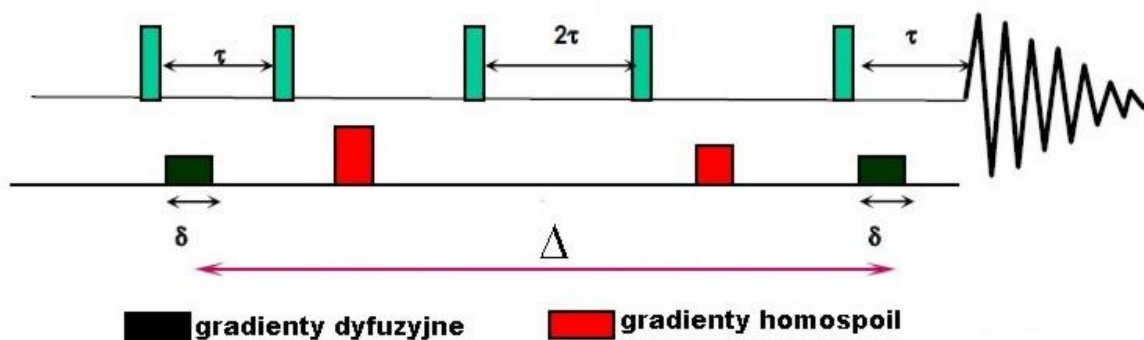
Do badań dyfuzji translacyjnej polimerów gwiazdzistych wykorzystano spektrometr NMR Agilent 400 MHz (Rysunek 18) przystosowany zarówno do badań fazy skondensowanej, jak też cieczy i roztworów w polu magnetycznym o indukcji 9.4 T.



Rysunek 18 Spektrometr NMR Agilent 400 MHz

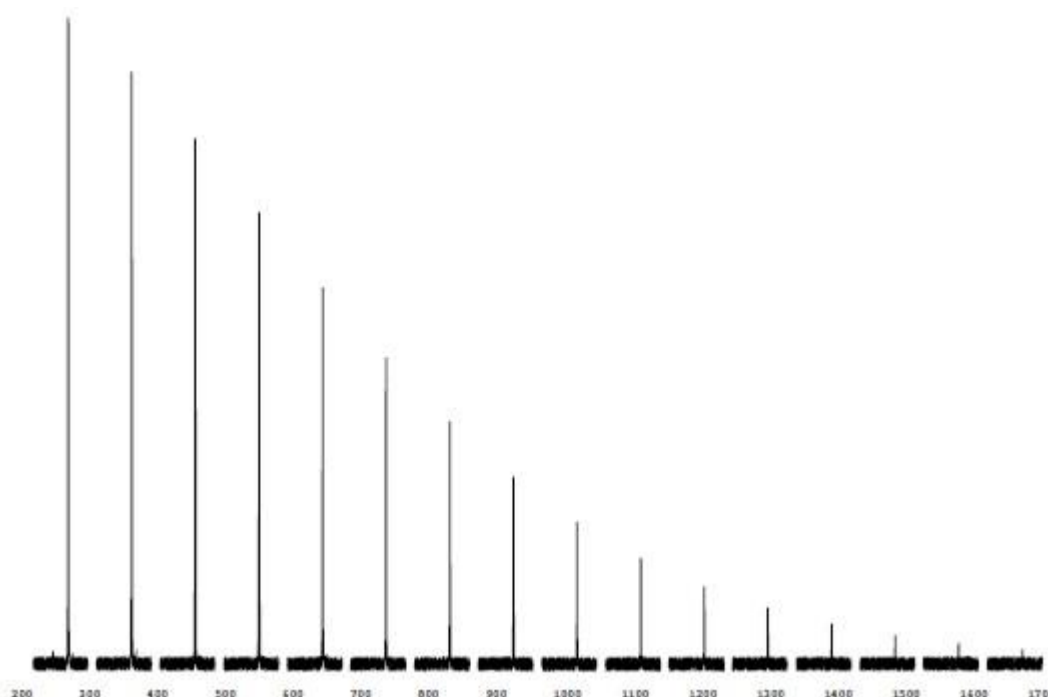
Badania dyfuzji translacyjnej gwiazd polimerowych przeprowadzone zostały z zastosowaniem metody echa stymulowanego z impulsowym gradientem pola magnetycznego (ang. PGSE Pulsed Gradient Spin Echo), natomiast analizę wyników wykonano z zastosowaniem techniki DOSY (ang. Diffusion Ordered Spectroscopy). Badania te umożliwiły wyznaczenie współczynników dyfuzji translacyjnej molekuł, a na ich podstawie wykonano obliczenia średnicy hydrodynamicznej molekuł badanych polimerów oraz sprawdzono, czy stężenie gwiazd polimerowych w roztworze modyfikuje szybkość ich ruchu translacyjnego. W celu określenia zależności współczynnika dyfuzji od stężenia polimeru wykonano pomiary dla roztworów D₂O próbek KW-1-76A oraz KW-1-76B o stężeniach 4 mg/ml, 8 mg/ml i 16 mg/ml, a próbek KW-1-76C i KW-1-76D o stężeniach 4 mg/ml i 8 mg/ml. Stosując rozpuszczalnik bezprotonowy radykalnie eliminuje się silny sygnał od protonów wody, który zwykle zaburza rejestrowane widmo. Roztwory umieszczone zostały w szklanych probówkach o średnicy 5 mm, które są zwykle stosowane w spektroskopii NMR wysokiej zdolności rozdzielczej. Pomiary współczynników dyfuzji przeprowadzono według standardowego protokołu (shimowanie pola B₀, stabilizacja temperatury próbki, pełna relaksacja magnetyzacji, itp.). Pomiary przeprowadzono w temperaturze 293 K. Do pomiaru używano sekwencji echa stymulowanego z impulsowym gradientem pola magnetycznego (Dpfgdste – DOSY Pulse Field Gradient Double Stimulating Echo), której uproszczony schemat przedstawia rysunek 19. W sekwencji pomiarowej używano 32 wartości gradientów dyfuzyjnych G, w zakresie od 20 Gs/cm do 1750 Gs/cm, w formie impulsów o stałej długości $\delta = 2$ ms. Odstęp Δ pomiędzy impulsami gradientowymi G wynosił $\Delta = 50$ ms.

W celu poprawy stosunku S/N rejestrowanych widm stosowano koherentne sumowanie sygnału zaniku swobodnej precesji (akumulację sygnału FID) w zakresie od 16 do 32. Czas powtarzania sekwencji wynosił 10 s.



Rysunek 19 Uproszczony schemat sekwencji Dpfgdste do pomiarów współczynnika dyfuzji

W celu wyeliminowania sygnału echa spinowego Hahna, który pojawia się w chwili 2τ i może interferować z sygnałem echa stymulowanego zakłócając jego amplitudę, stosowano dodatkowe gradienty zwane homospoil gradients. Przykładowy wynik pomiaru współczynnika dyfuzji, przedstawiający tłumienie intensywności linii rezonansowej gwiazdy polimerowej w roztworze, pokazano na rysunku 20. Przesunięcie linii rezonansowej, rejestrowanej podczas pomiaru, wynosi 3.65 ppm i przypisano ją grupom $-\text{CH}_2$ w łańcuchu polimeru PEO. Sygnał pochodzący od tych grup ma największą intensywność i dlatego został wybrany do wyznaczenia współczynników dyfuzji.



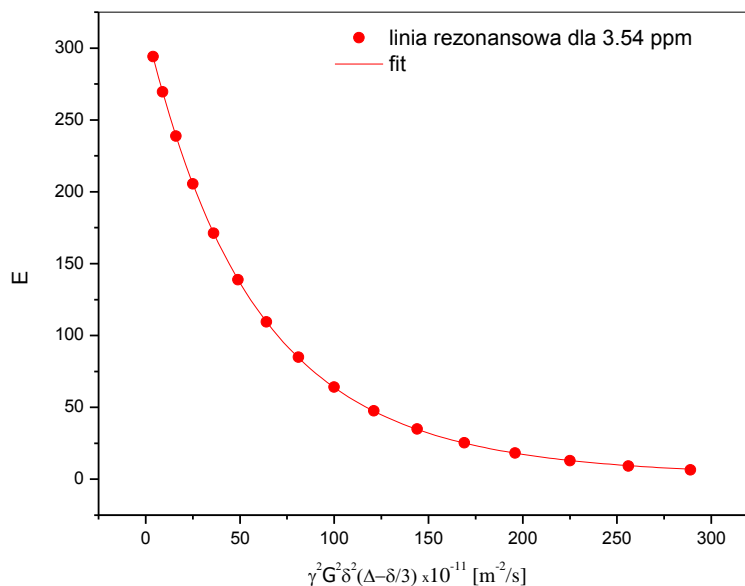
Rysunek 20 Tłumienie dyfuzyjne intensywności linii rezonansowej gwiazdy polimerowej KW-1-76B w roztworze wodnym

Tłumienie dyfuzyjne intensywności linii rezonansowej, z pominięciem procesów relaksacji, przedstawione na rysunku 21, jest opisane równaniem:

$$E = \exp\left(-\gamma^2 D G^2 \Delta \delta^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right)\right) \quad (5)$$

w którym γ – jest współczynnikiem magnetogirycznym jąder atomu wodoru, G – wartością gradientu pola magnetycznego, Δ – odległością między impulsami gradientowymi G , δ – szerokością impulsów gradientowych i D – współczynnikiem dyfuzji. Wartość współczynnika dyfuzji D można wyznaczyć metodą regresji liniowej jako współczynnika

nachylenia linii prostej reprezentującej zależność logarytmu unormowanej amplitudy linii rezonansowej E od kwadratu wartości gradientu pola magnetycznego G.



Rysunek 21 Tłumienie dyfuzyjne dla próbki KW-1-76B o stężeniu 4 mg/ml

5.2.5 Skaningowa kalorymetria różnicowa (DSC)

Badania właściwości termodynamicznych polimerów gwiazdzistych wykonano za pomocą skaningowego kalorymetru różnicowego DSC firmy Perkin Elmer (Rysunek 22), z zastosowaniem metody kompensacji mocy. Aparat wyposażony jest w sensor, dzięki któremu można uzyskać bardzo małą stałą czasową, a tym samym zachować dużą czułość pomiarów. Pomiarów można prowadzić w zakresie temperatur od 93 K do 673 K, stosując szybkości chłodzenia/grzania od 0.001 do 200 K/min.



Rysunek 22 Skaningowy kalorymetr różnicowy z kompensacją mocy DSC (Perkin Elmer)

Do badań kalorymetrycznych zastosowano próbki, których masy wahały się od 5 do 6 mg. Każda z nich była umieszczona w aluminiowym naczynku, które zamykano hermetycznie za pomocą prasy w celu odizolowania próbki od gazów zawartych w powietrzu (np. tlenu), które znajdują się w komorze kalorymetru. Kapsułkę z próbką umieszczano bezpośrednio w komorze pomiarowej. Próbkę referencyjną stanowiło puste naczynko. Termogramy zarejestrowano z tempem 10 K/min, najpierw w trybie chłodzenia (do 173 K), a następnie grzania (do 373 K) oraz w celu usunięcia historii termicznej, powtórnego chłodzenia i grzania (od 173 K do 373 K).

5.2.6 Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM)

W celu oceny morfologii oraz rozmiarów gwiazd polimerowych wykorzystano skaningowy mikroskop elektronowy (SEM Jeol 7001TTLS, Rysunek 23). Obrazy uzyskano w modzie obrazowania elektronami wtórnymi (SEI), stosując napięcie przyspieszające 10 kV i 15kV.



Rysunek 23 Skaningowy mikroskop elektronowy (Jeol)

Przygotowano dwa roztwory wodne polimerów o stężeniach 0.2 mg/ml oraz 10 mg/ml, a także roztwory o takich samych stężeniach, w których rozpuszczalnikiem był metanol. Kroplę roztworu nanoszono na krzemowy wafel, a następnie stosując metodę „spin coatingu”, dzięki ruchowi obrotowemu otrzymywano cienką warstwę próbki równomiernie rozprowadzoną na powierzchni wafla. Parametry „spin coatingu” zostały dobrane tak, aby uzyskać jak najcieńszą warstwę badanych roztworów, co umożliwia szybkie odparowanie

rozpuszczalnika z próbki, zapewniając separację cząsteczek polimerów znajdujących się w roztworze. Tak przygotowane próbki napyłono warstwą przewodzącą (złoto : platyna, w stosunku 80:20) w celu zapewnienia swobodnego przepływu elektronów w obrazowanej warstwie, co zapewnia ich odpływ z próbki.

5.2.7 Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM)

W celu zobrazowania pojedynczej gwiazdy polimerowej wykonano zdjęcia próbki polimeru gwiaździstego KW-1-76C za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego 120kV (TEM Jeol). Przygotowano roztwory gwiazd polimerowych o stężeniu 10 mg/ml i 0.2 mg/ml w dwóch rozpuszczalnikach – wodzie i metanolu. Wszystkie próbki przygotowano w następujący sposób – siatkę do badań TEM zanurzono w badanym roztworze, a następnie odłożono w osłonięte miejsce w celu odparowania rozpuszczalnika. Tak przygotowane próbki po ok. 0.5h do 2h (w zależności od rozpuszczalnika) zostały poddane badaniom z użyciem mikroskopu TEM z zastosowaniem napięcia przyspieszającego 120kV.

5.2.8 Mikroskopia polaryzacyjna (POM)

Analizę struktury badanych polimerów wykonano za pomocą mikroskopu polaryzacyjnego (Leica, Rysunek 24).



Rysunek 24 Mikroskop polaryzacyjny (Leica)

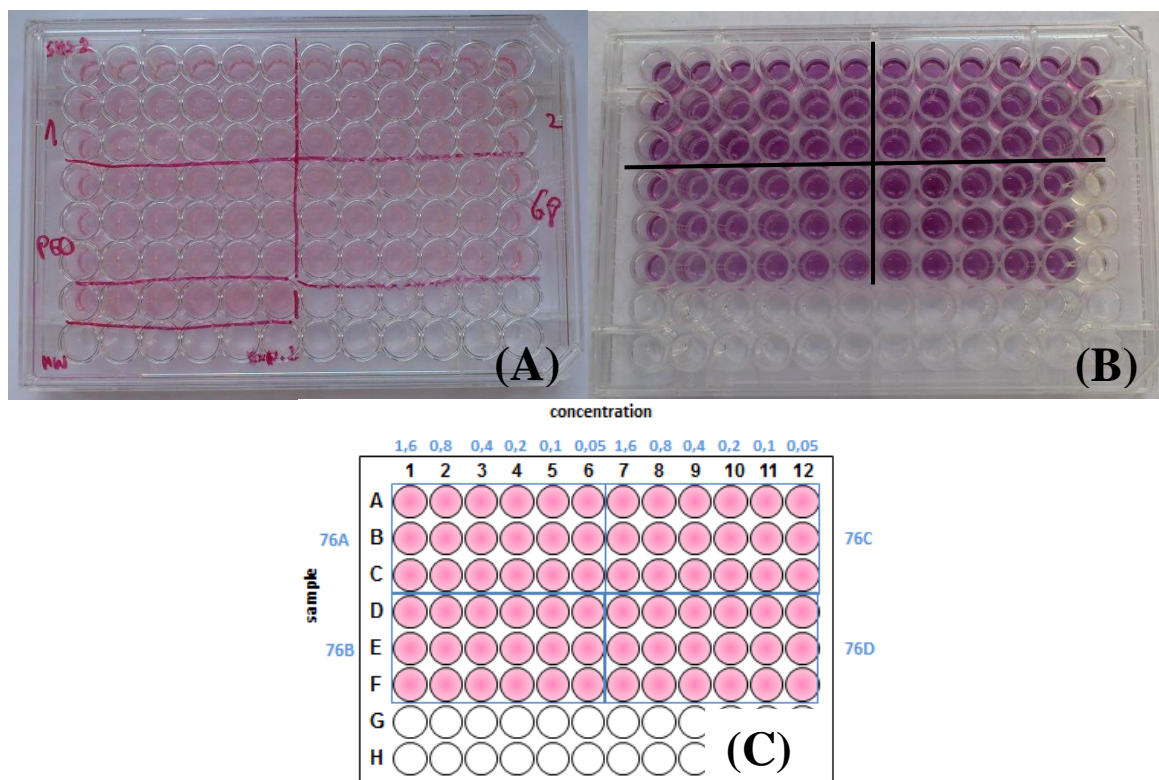
Przygotowanie polimeru do pomiaru polegało na stopieniu próbki na szkiełku laboratoryjnym, przy użyciu płyty grzewczej, a następnie próbkę dociśnięto szkiełkiem nakrywkowym. Otrzymaną cienką warstwę polimeru ponownie stopiono wygrzewając ją przez kilka minut powyżej temperatury topnienia T_m (wyznaczonej wcześniej na podstawie pomiarów kalorymetrycznych), co zapewniło pozabawienie polimeru historii termicznej. Stopioną próbkę umieszczano na stoliku grzewczym mikroskopu polaryzacyjnego zapewniając obniżenie temperatury poniżej T_m , co umożliwiło obserwację tworzenia sferolitów, powstających w wyniku procesów krystalizacji zachodzących w próbce. Obrazy uzyskane przy użyciu kamery CCD zapisywano w komputerze.

5.2.9 Test MTT

W badaniu zastosowano adherentną linię komórkową mięsaka prążkowanokomórkowego (*rhabdomyosarcoma* – RMS) SMS-CTN udostępnioną dzięki uprzejmości dr. Petera Houghtona. Komórki SMS-CTN były hodowane w pożywce, w temperaturze 310 K, przy 5% poziomie CO_2 oraz wilgotności względnej powietrza 90%. Medium użytym w hodowli było Dulbecco Modified Eagle's o wysokim poziomie glukozy (4.5 g/l), wzbogaconym w 10% płodową surowicę bydlęcą (Gibco) oraz streptomycynę i penicylinę (Gibco).

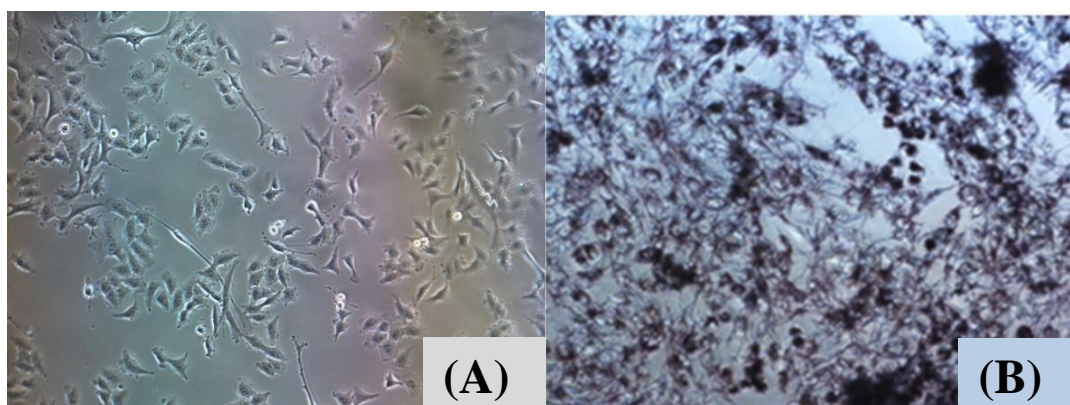
Komórki zostały wysiane na 96 dołkowe płytki (Sarstedt) w ilości $2 \cdot 10^3$ komórek na dołek w końcowej objętości 100 μ l pełnego medium (Rysunek 25 (A)). Komórki poddawano inkubacji z badanymi związkami po 24 godzinach od wysiewu. Bezpośrednio przed wymianą pożywki hodowlanej przygotowano szereg rozcieńczeń w seryjnych, dwukrotnie malejących stężeniach od 1.6 mg/ml do 0.05 mg/ml. Kontrolę stanowiły komórki, w których medium hodowlane nie zawierało badanych związków.

Każdy punkt pomiarowy odpowiadający określonej stężeniu badanej substancji był wykonany w tryplikacie. Ponadto eksperyment wykonano w 3 niezależnych biologicznych powtórzeniach. Do każdej studzienki dodawano po 100 μ l roztworu o określonym rozcieńczeniu badanej substancji w podłożu, w kolejności od najniższego do najwyższego stężenia. Komórki inkubowano przez 24 godziny. Po inkubacji komórek z badanymi polimerami podłoże usuwano i do każdej studzienki dodawano po 100 μ l odczynnika MTT o stężeniu 0.5 mg/ml (Sigma-Aldrich). Hodowlę następnie inkubowano przez 1 – 2 godziny w wyżej wymienionych warunkach.



Rysunek 25 Hodowla komórkowa SMS-CTN: poddana stymulacji badanymi związkami (A); po dodaniu MTT (B), schematyczne przedstawienie wysianych komórek na płytce (C)

Po inkubacji można było zaobserwować zmianę zabarwienia medium (Rysunek 25) oraz wytrącone kryształy formazanu (Rysunek 26). Płyn z nad kryształów usuwano delikatnie przez odpipetowanie, następnie do każdej studzienki dodano 50 μ l izopropanolu z kwasem solnym (mieszanka w stosunku 1:50, kwasu solnego z izopropanolem) i łagodnie wytrząsano przez kilka minut w celu rozpuszczenia kryształów. Absorbancję roztworów mierzono spektrofotometrycznie stosując falę o długości 570 nm z zastosowaniem czytnika płytek (Tecan).



Rysunek 26 Komórki SMS-CTN (A); komórki SMS-CTN, w których wytworzyły się kryształy formazanu na skutek aktywności MTT (B)

5.2.10 Test wydajności transfekcji

Zdolność gwiazd polimerowych do dostarczania kwasów nukleinowych, w formie plazmidowego DNA kodującego enzym – lucyferazę (FLuc, pGL3-basic vector, Promega), została zbadana za pomocą testu lucyferazy na komórkach S2 (*Drosophila Schneider 2*). Komórki S2 zostały wysiane na 96 dołkowe płytki (Sarstedt) w ilości $2 \cdot 10^3$ komórek na dołek, i dopełnione do ostatecznej objętości 100 μ l pełnego medium.

Polipleksy przygotowano poprzez wstępne zmieszanie, przez 10 minut, 5 μ l plazmidu reporterowego FLuc (pGL3, Promega – 20 ng) w odrębnych, niezależnych probówkach odpowiednio z roztworami 6; 1.2; 0.12; 0.06; 0.012; 0.0012 oraz 0.00012 mg/ml gwiazdy polimerowej w buforze, którym był 1X PBS. W reakcji kontrolnej reportera pGL3, plazmid transfekowano za pomocą komercyjnie dostępnego odczynnika transfekującego, jakim jest FuGENE HD, przy użyciu standardowego protokołu opisanego przez Ruby i inni [130] (pozytywna kontrolna) albo nie użyto żadnego odczynnika do transfekcji (negatywna kontrola). Płytkę inkubowano przez 9 godzin, a następnie dodano 10 μ l roztworu 5.5 mM CuSO₄ do każdej studzienki w celu wywołania ekspresji genu reporterowego. Po 24 godzinach od transfekcji, do każdej studzienki dodano 20 μ l buforu do lizy (1X PLB), a płytkę poddano wytrząsaniu przez 15 minut. Pomiar aktywności lucyferazy w każdej studzience dokonano za pomocą pomiaru absorbancji. Absorbancję roztworów zmierzono spektrofotometrycznie przy długości fali 570 nm, z zastosowaniem czytnika płytek (Tecan).

6 PREZENTACJA WYNIKÓW

6.1 Synteza biokompatybilnych polimerów gwiaździstych na bazie poli(glikolu etylenowego) z kationowym i degradowalnym rdzeniem

6.1.1 Synteza crosslinkera

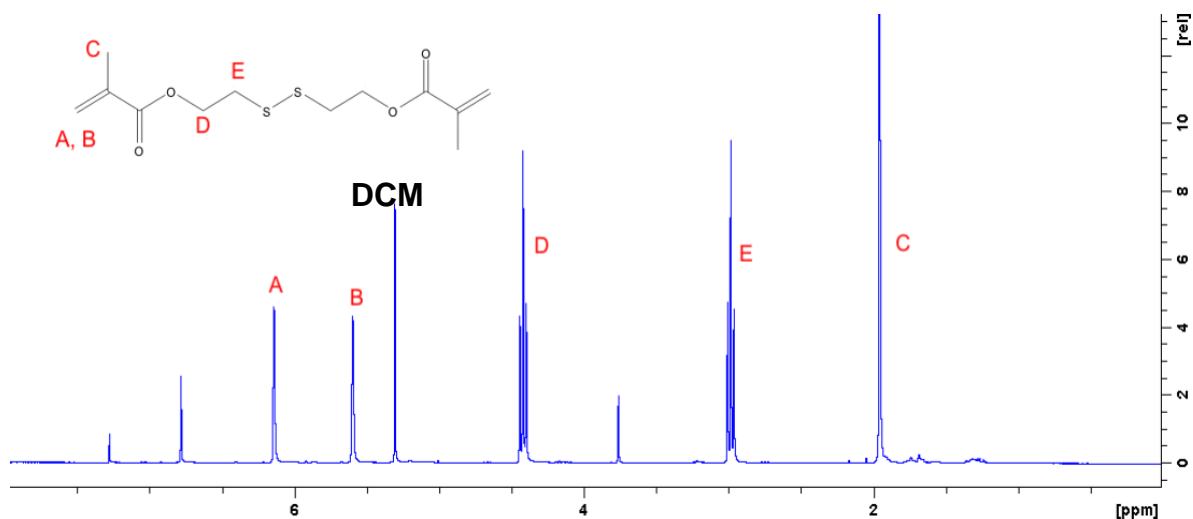
W celu zsyntetyzowania gwiazd polimerowych w pierwszym kroku przeprowadzono reakcję, która miała na celu uzyskanie biodegradowalnego monomeru sieciującego jakim jest dwusiarczek bis (2-metakryloilo) oksyetylu (DSDMA), którego wzór strukturalny przedstawiono na rysunku 27. Warunki reakcji (współczynniki molowe oraz ilości poszczególnych reagentów) zostały zamieszczone w tabeli 1. Najpierw dwusiarczek bis(2-hydroksy) etylu (BHEDS) wraz kwasem metakrylowym rozpuszczono w 100 mL dichlorometanu (DCM) i umieszczono w kolbie reakcyjnej. Następnie N,N-dicykloheksylokarbodiimid (DCC) i 4-(dimetyloamino) pirydynę (DMAP) rozpuszczono w niewielkiej ilości DCM i oba reagenty dodawano bardzo powoli do mieszaniny reakcyjnej. Mieszaninę reakcyjną przygotowano w kolbie okrągłodennej (o pojemności 250 ml), którą umieszczono w łaźni z lodem i pozostawiono na noc.

Tabela 1 Warunki reakcji do syntezy DSDMA

	Stosunki molowe	Współczynniki molowe	Ilość
Bis(2-hydroxy ethyl) disulfide (BHEDS)	1	0.025	3.856 g
Kwas metakrylowy	2.1	0.0525	4.518 g
DCC	2.2	0.055	11.348 g
DMAP	5%mol	0.005375	0.657 g
DCM			150ml

Następnego dnia DCC odsączono z mieszaniny reakcyjnej. W celu oczyszczenia otrzymanej substancji przygotowano kolumnę z krzemionką i zebrano odpowiednią frakcję zawierającą oczyszczony crosslinker. Wydajność tej reakcji wyniosła 84.1%. W celu potwierdzenia otrzymania zaprojektowanej struktury DSDMA, zarejestrowano widmo NMR otrzymanej substancji rozpuszczonej w chloroformie (Rysunek 27). Należy

nadmienić, że po przeprowadzeniu reakcji dodano inhibitor, aby zapobiec polimeryzacji. W następnym etapie przygotowania gwiazd polimerowych, przed użyciem crosslinkera, inhibitor został usunięty w procesie przepuszczenia substancji przez kolumnę z zasadową aluminią.



Rysunek 27 Widmo ¹H NMR crosslinkera DSDMA

6.1.2 Synteza gwiazd polimerowych

Badane w niniejszej pracy polimery gwiazdziste zostały zsyntetyzowane za pomocą polimeryzacji rodnikowej z przeniesieniem atomu (ATRP) poprzez metodę „arm first”, przy czym wykorzystano procedurę „one pot”, co oznacza, że wszystkie składniki były umieszczone w jednej kolbie reakcyjnej. Przeprowadzono cztery reakcje różniące się udziałami poszczególnych składników. Stosunki molowe reagentów w poszczególnych reakcjach podano w tabeli 2. Należy podkreślić, że stosunki molowe zostały dobrane tak, aby wzrost udziału kationowego monomeru w reakcji prowadził do uzyskania polimerów o coraz silniejszych właściwościach kationowych, w kolejności od KW-1-76A do KW-1-76D. Taka strategia miała na celu optymalizację ilości DMAEMA niezbędnej do uzyskania układów polimerowych o wysokiej zdolności kompleksowania kwasów nukleinowych i uzyskania jak najlepszych wyników transfekcji.

Tabela 2 Stosunki reagentów użyte w poszczególnych reakcjach

	[PEGMA] ₀ /[DMAEMA] ₀ /[SDSMA] ₀ /[EBiB] ₀ /[CuBr] ₀ /[CuBr ₂] ₀ /[HMTETA] ₀
KW-1-76A	1/ 0.5 / 1 /0.2/0.19/0.01/0.2
KW-1-76B	1/ 1 / 1 /0.2/0.19/0.01/0.2
KW-1-76C	1/ 2 / 1 /0.2/0.19/0.01/0.2
KW-1-76D	1/ 4 / 1 /0.2/0.19/0.01/0.2

Jako przykład posłuży reakcja dla próbki KW-1-76A, która została przygotowana w następujący sposób: PEG₄₅MA (Mn = 2080, 2.0 g, 1.0 mmol), DMAEMA (78.6 mg, 0.5 mmol), SDSMA (290.4 mg, 1.0 mmol), HMTETA (54.4 μL, 0.2 mmol), CuBr₂ (2.23 mg, 0.2 mmol), toluen (0.5 ml jako standard wewnątrz do oznaczeń GPC i GC) i metanol (10 mL) zostały umieszczone w kolbie Schlenka. Z kolby usunięto tlen poprzez zastosowanie pięciu cykli typu freeze-pump-thaw (zamrożenie-odpompowanie-rozmrożenie), a następnie kolbę napełniono azotem. W atmosferze azotu dodano odpowiednią ilość CuBr (27.3 mg, 0.19 mmol) do zamrożonej mikstury. Kolbę zamknięto szklanym korkiem, a następnie wypełniono ponownie azotem, po czym zanurzono w łaźni olejowej o temperaturze 60°C. W osobnej, zamkniętej i uszczelnionej fiolce został odtleniony inicjator w wyniku przepuszczenia przez tę fiolkę gazowego azotu (przez 30 min), co umożliwiło usunięcie tlenu z próbki. Odpowiednią ilość inicjatora EBiB (29.6 μl, 0.2 mmol) pobrano z fiolki, a następnie wstrzyknięto poprzez boczne ramię kolby Schlenka za pomocą mikrolitrowej, gazoszczelnej strzykawki przepłukanej azotem, do topiącej się mieszaniny reakcyjnej. W odpowiednich odstępach czasu pobierano próbki za pomocą strzykawki wyposażonej w igłę ze stali nierdzewnej. Połowa każdej z pobranych próbek została rozcieńczona acetonem w celu dokonania pomiarów konwersji monomerów za pomocą chromatografii gazowej (GC). Druga połowa każdej z tych próbek posłużyła do obserwacji zmian masy cząsteczkowej polimeru, które zaszły w wyniku reakcji polimeryzacji. Pomiar masy cząsteczkowej zostały wykonane z zastosowaniem metody chromatografii żelowej (GPC), z użyciem THF jako eluentu. Reakcję zatrzymano po 24 godzinach poprzez otwarcie kolby i ekspozycję mieszaniny reakcyjnej na powietrze. Otrzymany polimer gwiaździsty oczyszczano stosując dializę próbek przez 4 dni, przy czym w pierwszych dwóch dniach dializa była prowadzona w obecności wody destylowanej, a przez następne dwa dni w obecności metanolu. W obu przypadkach użyto

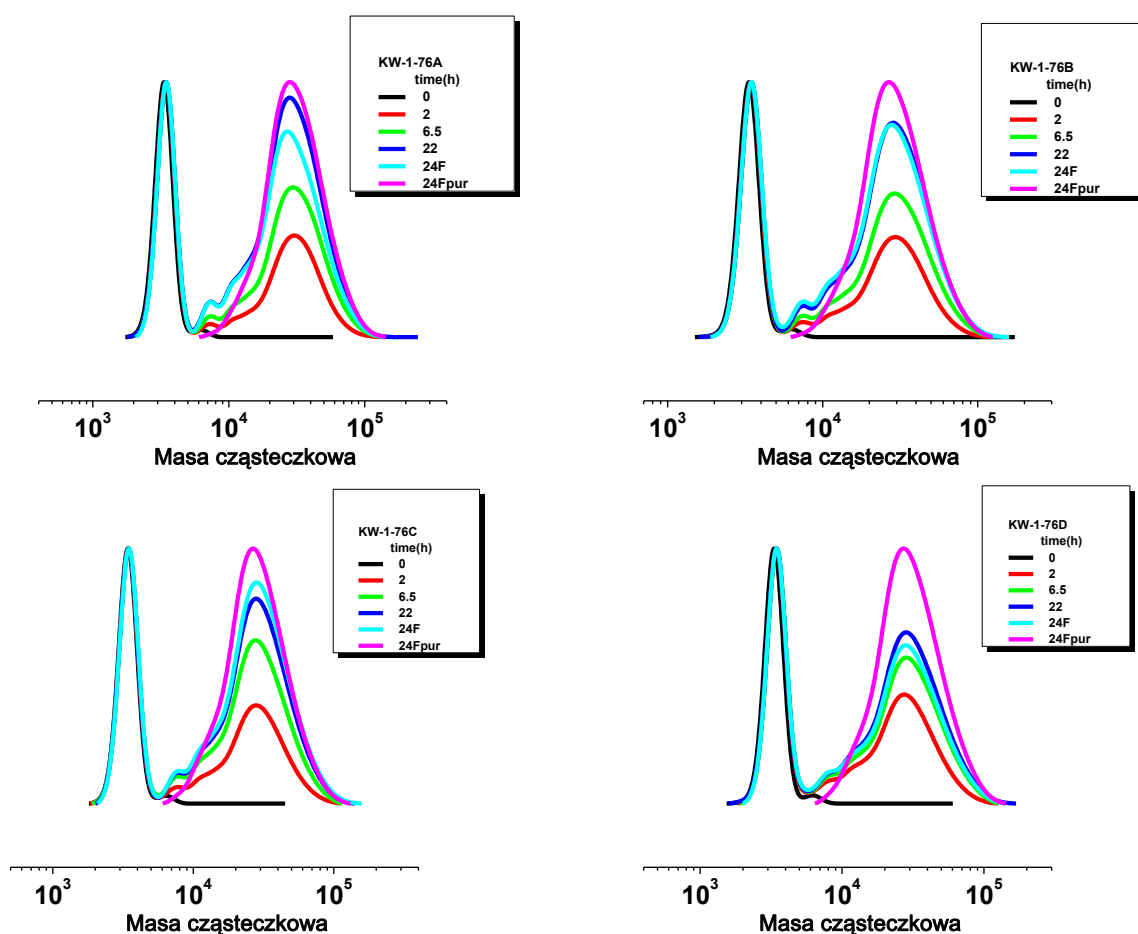
membrany dializacyjnej o masie cząsteczkowej odcięcia MWCO = 25000 Da. Analogiczną procedurę zastosowano dla pozostałych syntezowanych polimerów gwiazdzistych. Wszystkie polimery po oczyszczeniu zostały poddane procesowi suszenia na powietrzu, a następnie pod próżnią. Tak otrzymane polimery gwiazdziste zostały poddane dalszej analizie. Końcową masę cząsteczkową polimerów gwiazdzistych oznaczano metodą GPC MALLS, a ogólną kompozycję gwiazdy przez konwersję monomerów zmierzonych za pomocą GC. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 3 Właściwości zsyntezowanych polimerów. Wszystkie reakcje zostały przeprowadzone w 10 ml MeOH, 0.5 ml toluenu i 2.08 g PEGMA w temp. 60°C i zostały zatrzymane po 24h [PEGMA]₀/[EBiB]₀/[CuBr]₀/[CuBr₂]₀/[HMTETA]₀=1/0.2/0.19/0.01/0.2, ^a[DMAEMA]₀/[SSX]₀=0.5/1, ^b[DMAEMA]₀/[SSX]₀=1.0/1, ^c[DMAEMA]₀/[SSX]₀=2.0/1, ^d[DMAEMA]₀/[SSX]₀=4.0/1

Próbka	$M_{w, THF GPC}$ ($\times 10^3$) [g/dm ³]	M_w/M_n	conv, _{DMAEMA}	conv, _{DSDMA}	$M_{w, MALLS}$ ($\times 10^3$) [g/dm ³]	N_{arm}
KW-1-76A ^a	26.9	1.26	98 %	98 %	80.6	33
KW-1-76B ^b	25.6	1.24	83 %	90 %	78.7	33
KW-1-76C ^c	24.8	1.26	92 %	77 %	98.2	42
KW-1-76D ^d	25.9	1.28	82 %	81 %	86.7	37

Na rysunku 28 przedstawiono krzywe otrzymane w wyniku analizy zmian masy cząsteczkowej badanych próbek. Pomiary te wykonano z zastosowaniem chromatografii żelowej, na układzie pracującym w tetrahydrofuranie (THF – jako faza nośna) pozwalającym na określenie polidispersyjności polimerów oraz wyznaczenie wagowo średnich mas molowych (M_w) na podstawie uniwersalnej krzywej kalibracji wykonanej dla wąskich standardów polistyrenowych. Na wykresach przedstawiono krzywe uzyskane dla próbek pobieranych w trakcie przebiegu reakcji polimeryzacji. Na każdym z wykresów pierwszą krzywą, którą uzyskano dla próbki pobranej jeszcze przed rozpoczęciem polimeryzacji, oznaczono kolorem czarnym. Należy podkreślić, że każda z tych krzywych zawiera wyłącznie pik z maksimum, którego położenie odpowiada masie cząsteczkowej monomeru, co świadczy o tym, że w badanym układzie występują wyłącznie monomery, natomiast żadna z tych krzywych nie zawiera dodatkowego piku, który świadczyłby o obecności polimerów charakteryzujących się większą masą cząsteczkową. Natomiast dodatkowy pik pojawia się po 2h od momentu rozpoczęcia reakcji i widoczny jest na

wszystkich pozostałych krzywych, co świadczy o zachodzeniu reakcji polimeryzacji. Należy zaznaczyć, że krzywe rejestrowano co godzinę, jednak na rysunkach zamieszczono jedynie wybrane dane eksperymentalne. Ponadto można zaobserwować, iż maksimum odpowiadające powstającemu polimerowi wzrasta, co wskazuje na wzrost frakcji polimeru, natomiast zwięźanie się krzywej świadczy o zmniejszaniu się polidispersji badanych układów, towarzyszącej postępowi procesu polimeryzacji. Ostatnia krzywa oznaczona na wykresach jako 24Fpur jest krzywą, którą otrzymano dla oczyszczonej, wysuszonej, a następnie ponownie rozpuszczonej w THF próbki polimeru.



Rysunek 28 Krzywe chromatograficzne dla badanych próbek polimerów gwiazdzistych

Pomiary wykonane za pomocą chromatografii gazowej i żelowej pozwoliły na obliczenie średniej liczby ramion N_{arm} przypadającej na jedną cząsteczkę dla każdego ze zsyntetyzowanych polimerów gwiazdzistych. Do wyznaczenia N_{arm} wykorzystano poniższy wzór:

$$N_{arm} = \frac{M_{w,MALLS}}{M_{n,arm}} \times \frac{X_{arm}(m_{DMAEMA} + m_{PEG45MA})}{X_{arm}(m_{DMAEMA} + m_{PEG45MA}) + m_{core} conv_{core}} \quad (6)$$

gdzie $M_{w,MALLS}$ – średnia masa cząsteczkowa gwiazdy polimerowej wyznaczona za pomocą chromatografii żelowej z detektorem MALLS, $M_{n,arm}$ – suma mas cząsteczkowych monomeru PEG₄₅MA i DMAEMA, m_{DMAEMA} – masa monomeru DMAEMA użytego w reakcji, $m_{PEG45MA}$ – masa monomeru PEG₄₅MA użytego w reakcji, m_{core} – masa monomeru DSDMA użytego w reakcji, $conv_{core}$ – konwersja DSDMA, X_{arm} – udział wagowy ramion wbudowanych do gwiazdy w stosunku do początkowo dodanego monomeru PEG₄₅MA. X_{arm} został obliczony na podstawie poniższego wzoru:

$$X_{arm} = \frac{A_{star}(m_{DMAEMA}(dn/dc)_{DMAEMA} + m_{PEG45MA}(dn/dc)_{PEG45MA}) - (1 - A_{star})(dn/dc)_{core} m_{core} conv_{core}}{(m_{DMAEMA} + m_{PEG45MA})(dn/dc)_{arm}} \quad (7)$$

gdzie: m_{core} i $conv_{core}$ – masa monomeru DSDMA w wyjściowej mieszaninie i stopień jego przereagowania, $(dn/dc)_{arm}$ – gradient współczynnika załamania światła (wyznaczony z pomiarów GPC MALLS), A_{star} – frakcja polimerów gwiazdzistych, określona przez rozłożenie krzywej GPC na frakcje o dużej i małej masie cząsteczkowej z użyciem funkcji Gaussa. Wartości (dn/dc) dla liniowego PEG i polyDMAEMA w rozpuszczalniku THF, wynoszą odpowiednio 0.78ml/g i 0.149 ml/g [131] w temperaturze 308 K, natomiast wartość (dn/dc) dla polyDSDMA wynosi 0.058ml/g. Liczbę ramion w cząsteczce obliczoną dla poszczególnych polimerów zamieszczono w tabeli 3.

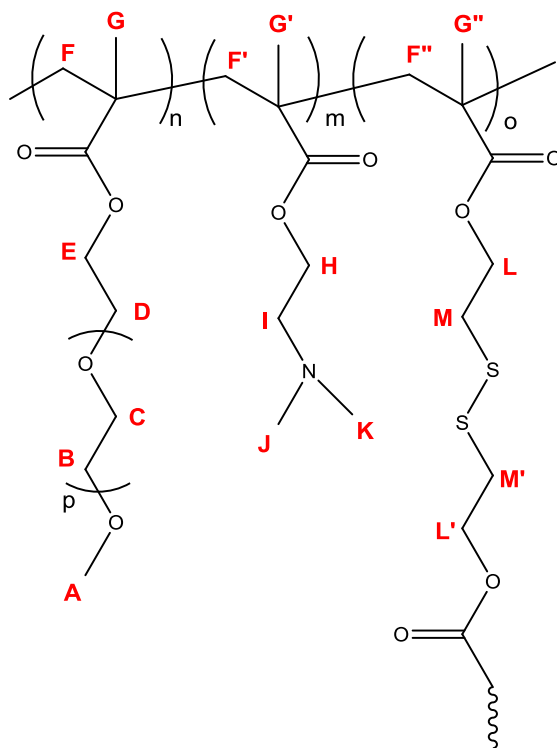
6.2 Badania struktury i dynamiki polimerów gwiazdzistych

6.2.1 Magnetyczny Rezonans Jądrowy (NMR)

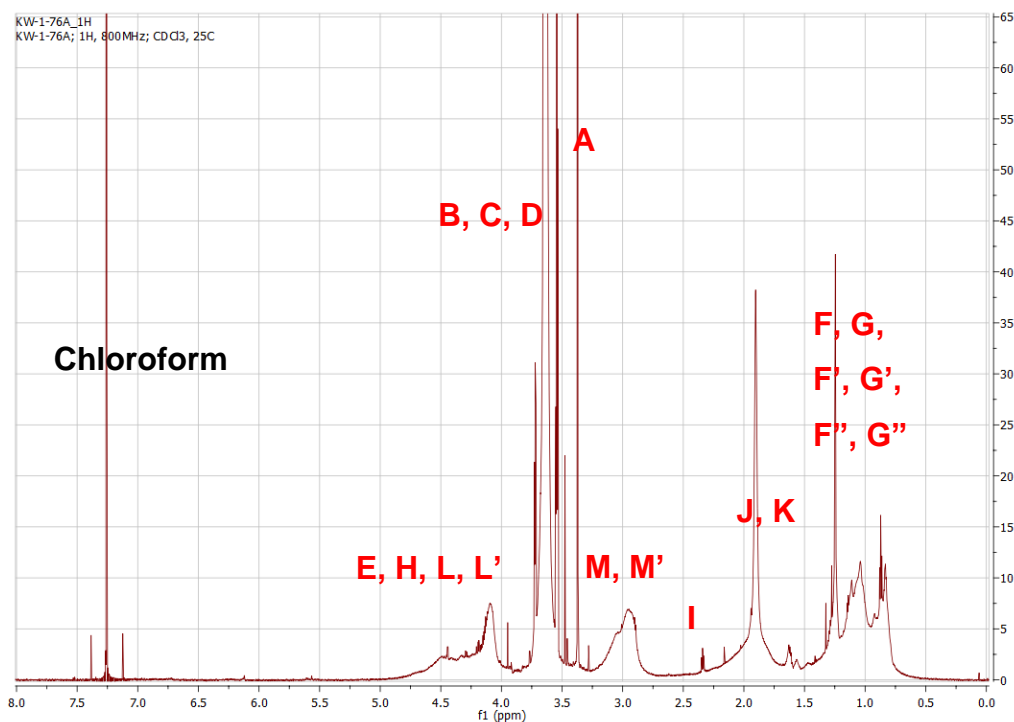
Dla otrzymanych polimerów, o wysokiej masie cząsteczkowej i niskiej polidispersyjności, przeprowadzono badania NMR, aby sprawdzić zgodność zaprojektowanej struktury z tą, którą uzyskano w wyniku reakcji polimeryzacji. Schematyczny wzór strukturalny polimeru gwiazdzistego przedstawiono na rysunku 29.

Na rysunkach 30 i 31 przedstawiono widma ¹H NMR roztworów próbek KW-1-76A oraz KW-1-76D w chloroformie. Widma uzyskane dla pozostałych dwóch próbek zamieszczono w dodatku A. Można zauważyć, że we wszystkich widmach położenia linii rezonansowych są podobne. W widmach można wyróżnić wąskie linie obserwowane w zakresie 3.5 – 3.7 ppm, które odpowiadają protonom „ruchliwych” grup oksyetylenowych (oznaczone jako B i C na schemacie) znajdujących się w ramionach PEO. W związku z tym, iż grupy –CH₃ znajdują się na końcu łańcuchów PEO i są bardzo

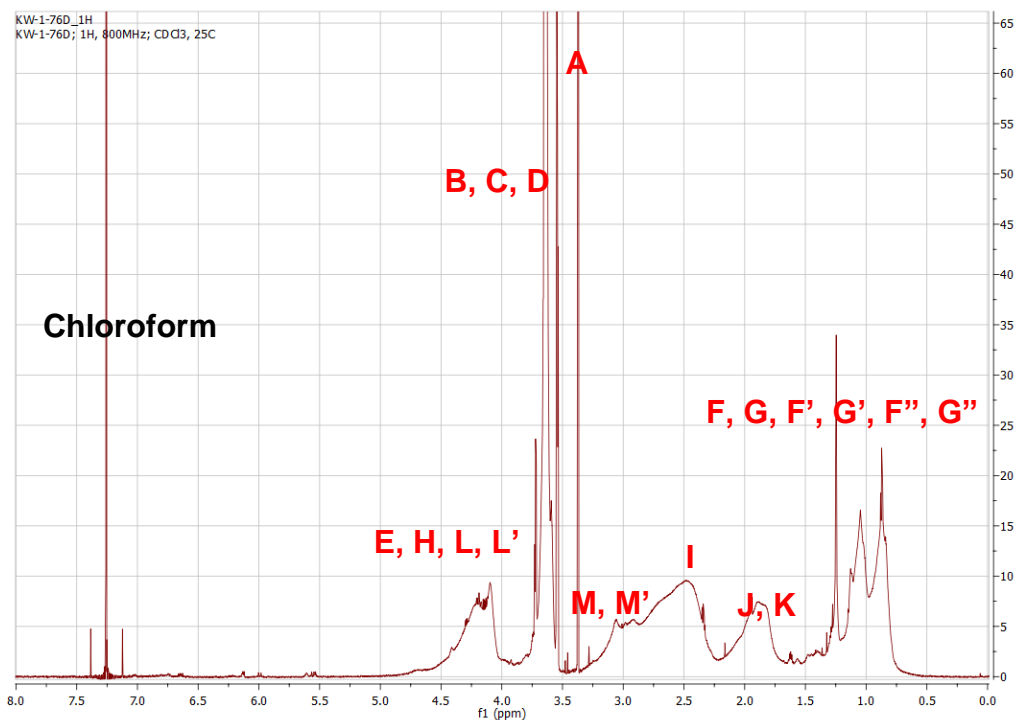
ruchliwe (protony oznaczone jako A), można dla nich zaobserwować wąską linię rezonansową znajdującą się przy 3.4 ppm. Natomiast protony grup $-CH_3$ sąsiadujących z czwartorzędowym węglem (oznaczone jako G, G' i G'') dają wkład do linii absorpcyjnej obserwowanej w zakresie od 0.5 do 1.5 ppm. Z kolei szerokie linie należy przypisać protonom grup usztywnionych, znajdującym się w rdzeniu gwiazdy. Należą do nich m.in. protony grup $-CH_2$ sąsiadujące z czwartorzędowym węglem (oznaczone F, F' oraz F''), które wykazują bardzo poszerzony sygnał występujący pomiędzy 0.5 – 1.5 ppm. Taką samą sytuację można zaobserwować w przypadku protonów grup $-CH_2$ znajdujących się w sąsiedztwie tlenu (oznaczone jako E, H, L i L'), którym odpowiada szeroka linia położona w zakresie od 4 do 4,5 ppm. Należy zauważyć natomiast różnice w szerokości linii absorpcyjnych, odpowiadających protonom grup $-CH_3$ w sąsiedztwie azotu (oznaczone jako J i K), które w przypadku próbek KW-1-76A i B położone są w zakresie 1.4 – 2.3 ppm oraz są liniami wąskimi poszerzonymi u podstawy, natomiast w przypadku KW-1-76C i D, charakteryzują się znacznym poszerzeniem. Szerokie linie rezonansowe odpowiadające protonom grup $-CH_2$, znajdujących się w sąsiedztwie siarki, położone są w zakresie 2.8 – 3.2 ppm. Z kolei protony grup $-CH_2$ znajdujących się w krótkich ramionach kationowego DMAEMA, przy azocie (oznaczone jako I), wyraźnie widoczne w przypadku próbek KW-1-76C i D w zakresie ok. 2.2 – 3 ppm są znacznie mniej intensywne dla próbek KW-1-76A i B.



Rysunek 29 Schematyczny wzór strukturalny gwiazdy polimerowej



Rysunek 30 Widmo ¹H NMR próbki KW-1-76A w chloroformie

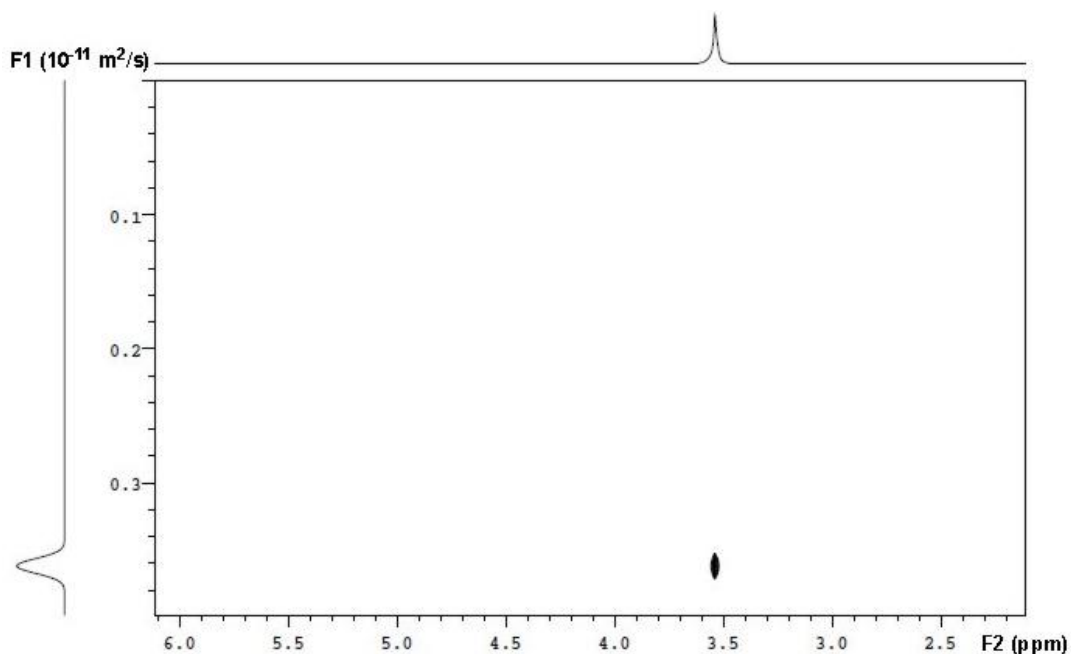


Rysunek 31 Widmo ¹H NMR próbki KW-1-76D w chloroformie

6.2.2 Dyfuzja (Magnetyczny rezonans jądrowy)

Pomiary współczynników dyfuzji translacyjnej zsyntezowanych roztworów polimerów gwiaździstych w D₂O wykonano metodą magnetycznego rezonansu jądrowego. Wynikiem

eksperymentów dyfuzyjnych są widma DOSY, z których jedno, dla wybranej próbki KW-1-76B, zostało przedstawione w formie kontur plotu na rysunku 32. Prezentowane widmo przedstawia kontur linii rezonansowej, której położenie i kształt można odczytać na osi poziomej, wyskalowanej w jednostkach przesunięcia chemicznego, a współczynnik dyfuzji D, na osi pionowej widma.



Rysunek 32 Widmo DOSY dla roztworu o stężeniu 4 mg/ml w D₂O próbki KW-1-76B

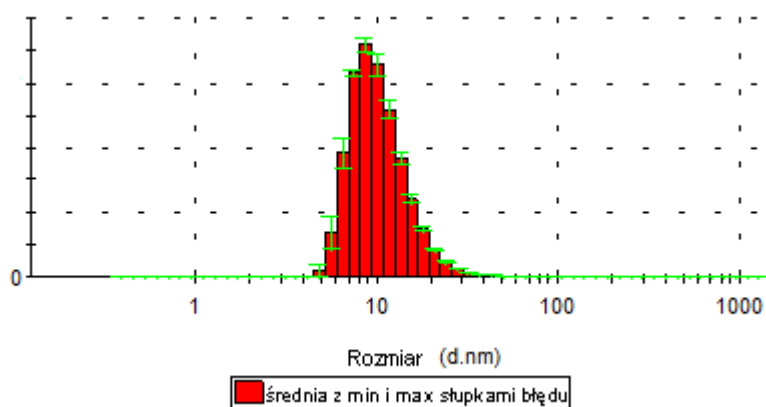
Tabela 4 Współczynniki dyfuzji i promienie hydrodynamiczne polimerów gwiazdzistych

		Współczynnik dyfuzji D 10 ⁻¹¹ [m ² /s]	Promień hydrodynamiczny R _h 10 ⁻⁹ [m]
KW-1-76A	4 mg/ml	2.54	6.78
	8 mg/ml	2.46	7.00
	16 mg/ml	2.48	6.95
KW-1-76B	4 mg/ml	3.70	4.66
	8 mg/ml	3.61	4.74
	16 mg/ml	3.46	4.95
KW-1-76C	4 mg/ml	4.22	4.05
	8 mg/ml	4.10	4.20
	16 mg/ml	-	-
KW-1-76D	4 mg/ml	2.75	6.26
	8 mg/ml	2.69	6.36
	16 mg/ml	-	-

Zmierzone wartości współczynników dyfuzji pozwoliły na obliczenie promieni hydrodynamicznych, a tym samym rozmiarów gwiazd polimerowych na podstawie zależności (2). Wyniki badań procesów dyfuzji dla roztworów zsyntetyzowanych polimerów gwiazdzistych w D₂O o stężeniach 4, 8 oraz 16 mg/ml zostały przedstawione w tabeli 4. Jak można zauważyć współczynniki dyfuzji nie ulegają znaczącym zmianom wraz ze wzrostem stężenia badanych roztworów polimerów gwiazdzistych.

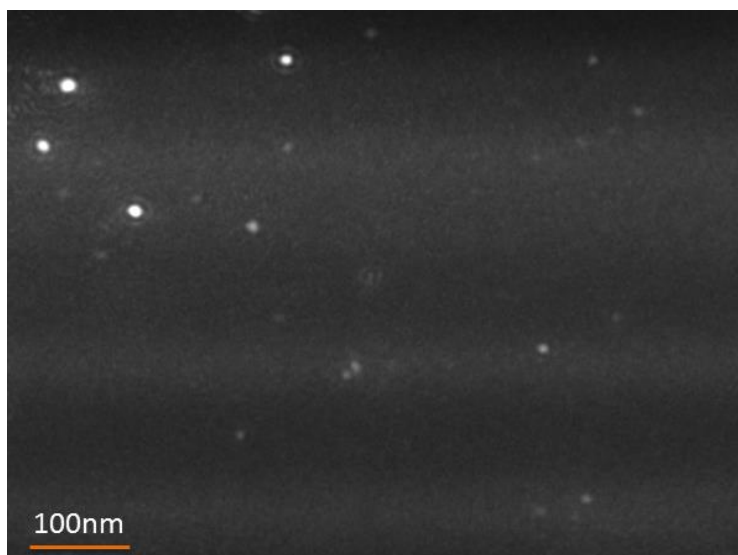
6.2.3 Dynamiczne rozpraszanie światła (DLS)

Otrzymane gwiazdy polimerowe zostały poddane badaniom z zastosowaniem dynamicznego rozpraszania światła w celu określenia ich wielkości oraz wyznaczenia potencjału zeta. Badaniom poddano próbki w postaci wodnych roztworów o stężeniu 4 mg/ml.



Rysunek 33 Rozkład średnic molekuł polimeru gwiazdzistego KW-1-76B w roztworze wodnym

Na rysunku 33 przedstawiono wykres rozkładu średnic molekuł dla wybranej próbki KW-1-76B w roztworze wodnym, otrzymany z zastosowaniem metody DLS. Każdy punkt pomiarowy wyznaczono jako średnią z trzech pomiarów. Wyznaczone na podstawie powyższych pomiarów średnice cząsteczek dla wszystkich badanych układów polimerowych przedstawiono w tabeli 5. Należy zauważyć, iż rozmiary średnic molekuł polimerów gwiazdzistych są zbliżone i wynoszą ok. 10 nm. Analiza obrazów polimerów gwiazdzistych w roztworze (Rysunek 34) uzyskanych za pomocą DLS nanosight potwierdza wyżej wymienioną wartość rozmiaru gwiazd polimerowych.



Rysunek 34 Zdjęcie uzyskane dla molekuł polimeru KW-1-76B w roztworze wodnym z użyciem DLS Nanosight

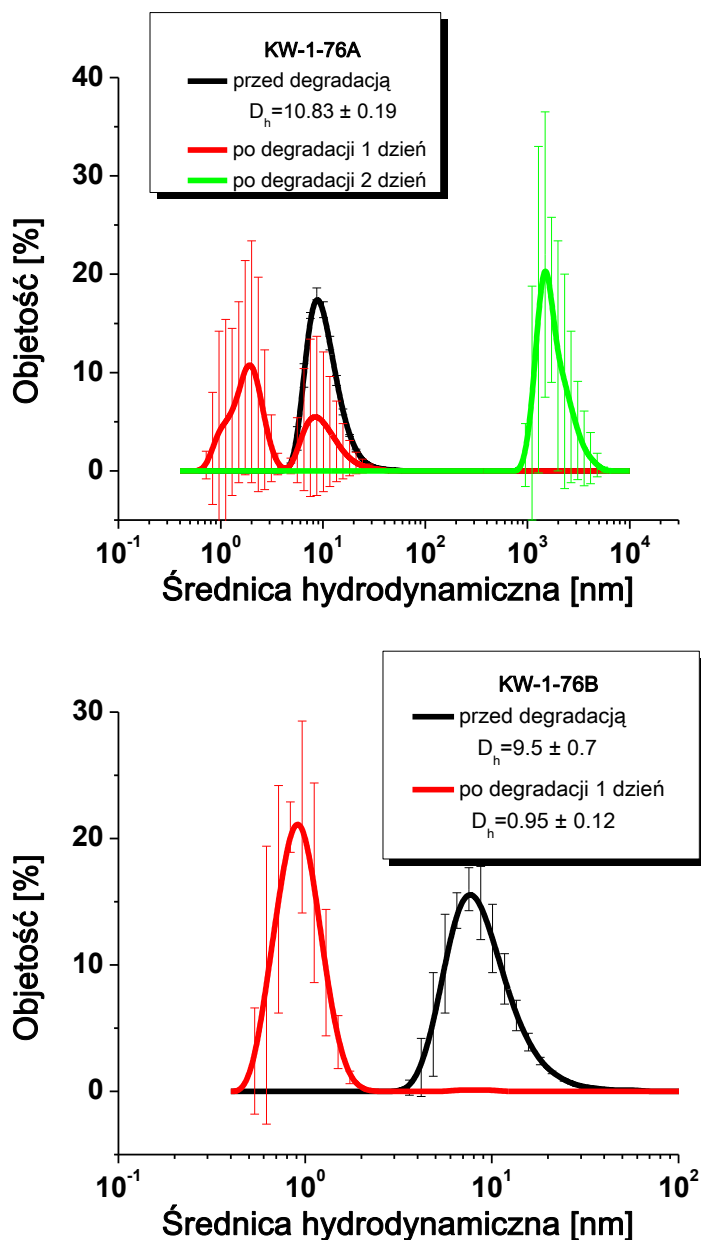
Przewidywano, że cząsteczka w próbce KW-1-76D, charakteryzującej się największą zawartością monomeru kationowego (zgodnie z analizą konwersji monomerów w reakcji polimeryzacji), będzie miała największy rdzeń, a tym samym będzie wykazywać największy rozmiar. Wyniki pomiarów wskazują jednak, że posiada ona najmniejszą średnicę o wartości 8.98 nm. Natomiast gwiazda KW-1-76A, z najmniejszą ilością kationowego składnika, odznacza się największą średnicą wynoszącą 10.83 nm.

Tabela 5 Wyniki pomiarów DLS dla polimerów gwiazdzistych

Próbka	Potencjał Zeta (mV)	D_h (nm)
KW-1-76A	-1.78 ± 0.35	10.83 ± 0.19
KW-1-76B	30.6 ± 2.1	9.5 ± 0.7
KW-1-76C	25.4 ± 2.8	9.99 ± 0.27
KW-1-76D	46.6 ± 2.5	8.98 ± 0.37

Przy pomocy DLS wyznaczono również potencjał zeta, którego wartości dla wszystkich badanych próbek zamieszczono w tabeli 5. W przypadku próbki KW-1-76A, cechującej się najmniejszą ilością kationowego monomeru kationowego (zgodnie z analizą konwersji monomerów w reakcji polimeryzacji), obserwowano ujemny potencjał zeta. Zgodnie z przewidywaniami wzrost zawartości składnika kationowego w badanych układach prowadził do wzrostu potencjału zeta, który dla wszystkich pozostałych próbek

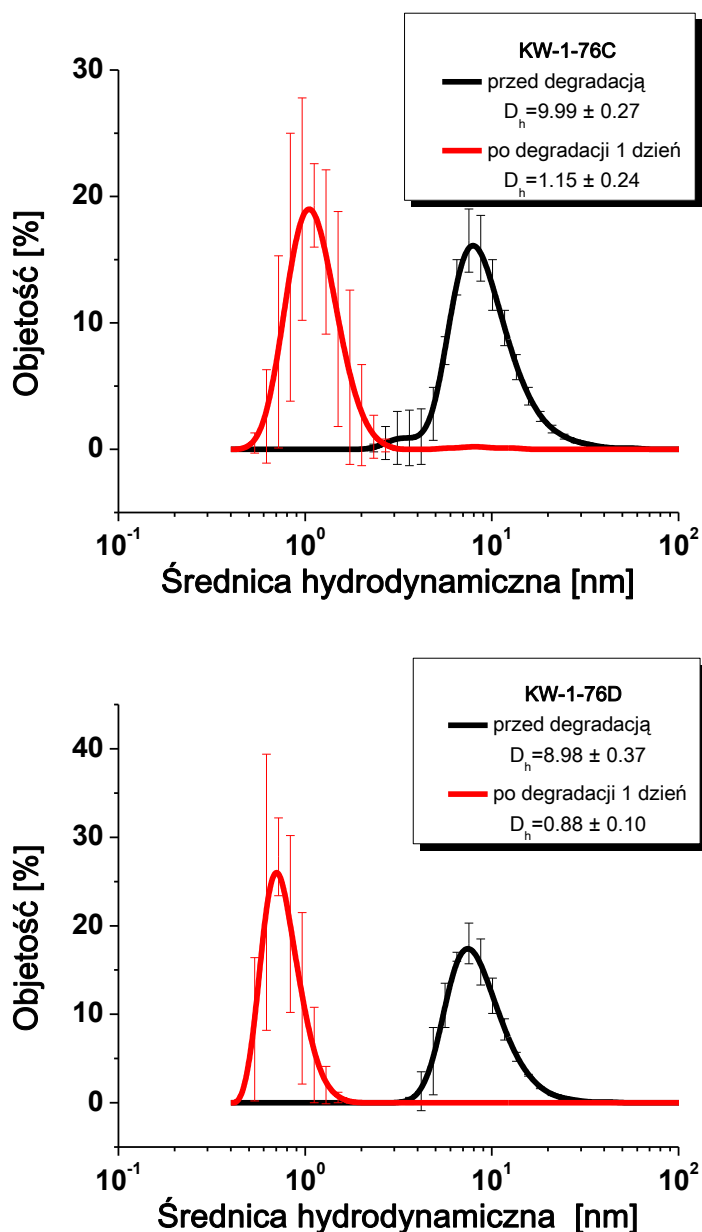
przyjmował wartości dodatnie, a jego największą wartość (46.6 mV) zaobserwowano w przypadku polimeru KW-1-76D, charakteryzującego się największą zawartością kationowego składnika.



Rysunek 35 Badania degradacji próbek KW-1-76A i KW-1-76B za pomocą DLS

Gwiazdy polimerowe dzięki znajdującym się w rdzeniu mostkom dwusiarczkowym mogą zostać zdegradowane do rozmiarów pozwalających na ich samoistne usunięcie przez komórkę. Metodę DLS zastosowano również do zbadania procesu degradacji polimerów gwiazdzystych. W tym celu najpierw sporządzono 100 mM roztwór glutationu (GSH), który występuje w komórkach żywych i jest odpowiedzialny za redukcję wiązań

dwusiarczkowych do grup –SH. Występujący naturalnie w organizmie ludzkim, GSH, będzie powodował proces rozpadu cząsteczek polimerów gwiaździstych wówczas, gdy zostaną one zastosowane w formie wektorów. Wyżej wymieniony roztwór został użyty do przygotowania roztworów gwiazd polimerowych o stężeniu 2 mg/ml. Wyniki badań zmian rozkładu średnicy hydrodynamicznej polimerów gwiaździstych w tym roztworze, występujące wskutek procesów degradacji, zostały przedstawione na rysunkach 35 i 36.



Rysunek 36 Badania degradacji próbek KW-1-76C i KW-1-76D za pomocą DLS

Przed degradacją średnica cząsteczek polimeru wynosiła ok. 10 nm, co objawiło się występowaniem maksimum rozkładu dla zbliżonej do tej wartości średnicy hydrodynamicznej cząsteczek. Już po jednym dniu zaobserwowano znaczącą zmianę

w rozkładzie średnic, a mianowicie pojawienie się piku odpowiadającego o rząd wielkości mniejszej średnicy cząsteczek. Dla badanych polimerów (z wyjątkiem próbki KW-1-76A), po czasie powyżej 24 godzin, w całym zakresie badanych średnic polimeru obserwowano za każdym razem tylko jedno maksimum, odpowiadające średnicom molekuł znacznie poniżej 1nm, świadczące o tym, iż wszystkie cząsteczki polimeru zdegradowały i w układzie nie występują agregaty. Eksperyment prowadzono przez okres 5 dni, jednakże w kolejnych dniach badań nie zaobserwowano już znaczących zmian średnicy polimeru. Jedynie w przypadku próbki KW-1-76A po 2 dniach degradacji pojawił się dodatkowy pik przy ok. 2000 nm, co może świadczyć o agregacji polimerów, która właściwie dotyczy ich zdegradowanych fragmentów. Pozostałe próbki są stabilne i nawet po poddaniu ich procesowi degradacji przez okres 5 dni nie zaobserwowano żadnego rodzaju agregacji.

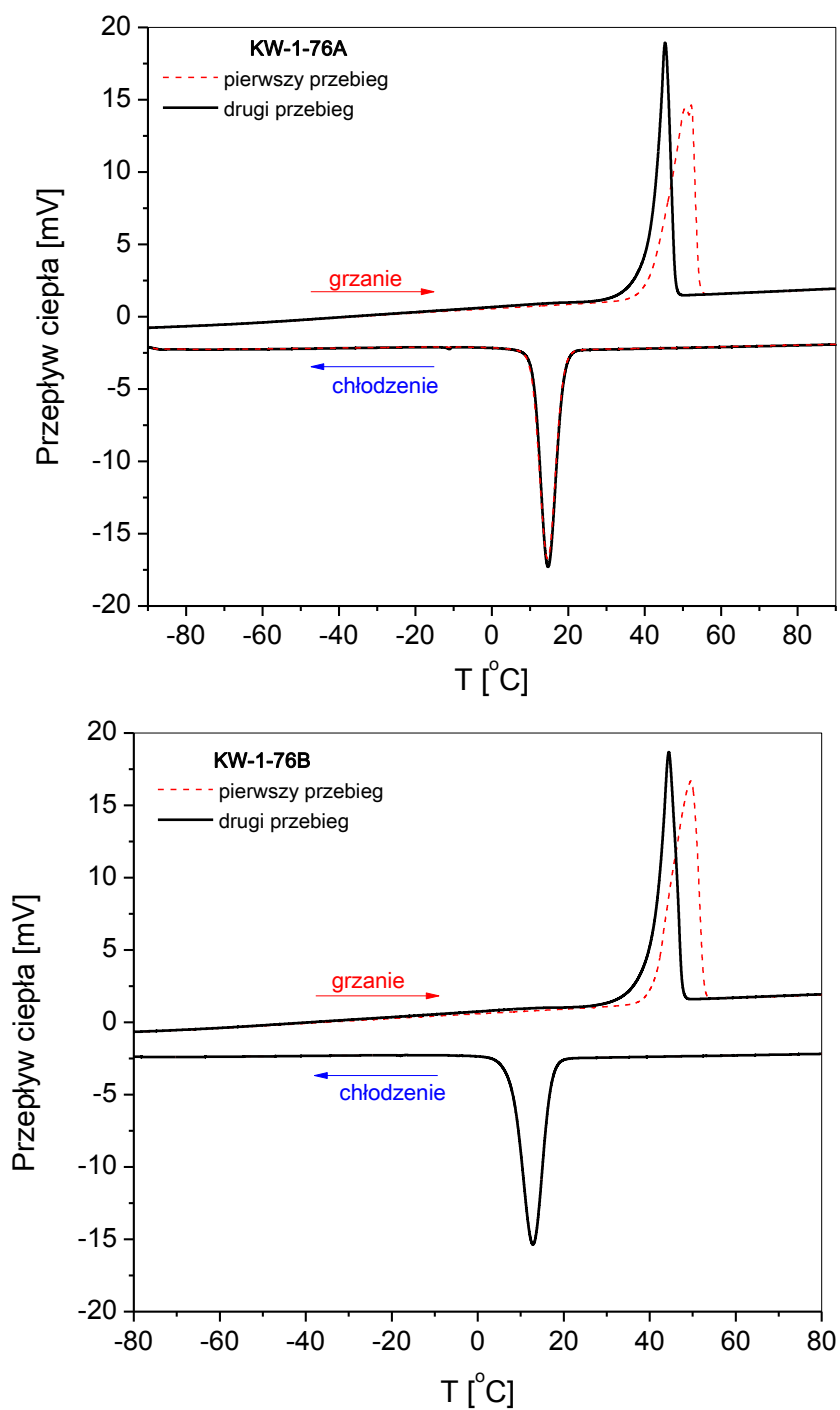
6.2.4 Skaningowa kalorymetria różnicowa (DSC)

Wykonano badania kalorymetryczne polimerów gwiazdzistych: KW-1-76A, KW-1-76B, KW-1-76C oraz KW-1-76D. Termogramy DSC uzyskane w trybie grzania i chłodzenia przedstawiono na rysunku 37 i rysunku 38. Na podstawie analizy pików topnienia i krystalizacji (wykonanej z zastosowaniem programu OriginPro 9.0) wyznaczono temperatury topnienia T_m i krystalizacji T_c dla wszystkich badanych układów. W celu określenia zmiany entalpii dla procesu topnienia (entalpia topnienia ΔH_m) oraz zmiany entalpii dla procesu krystalizacji (entalpia krystalizacji ΔH_c) obliczono pola powierzchni odpowiednio dla pików endotermicznych oraz egzotermicznych. Wartości wyżej wymienionych parametrów wyznaczone dla próbek pozbawionych historii termicznej (z termogramów uzyskanych dla próbki uprzednio stopionej) zamieszczono w tabeli 6.

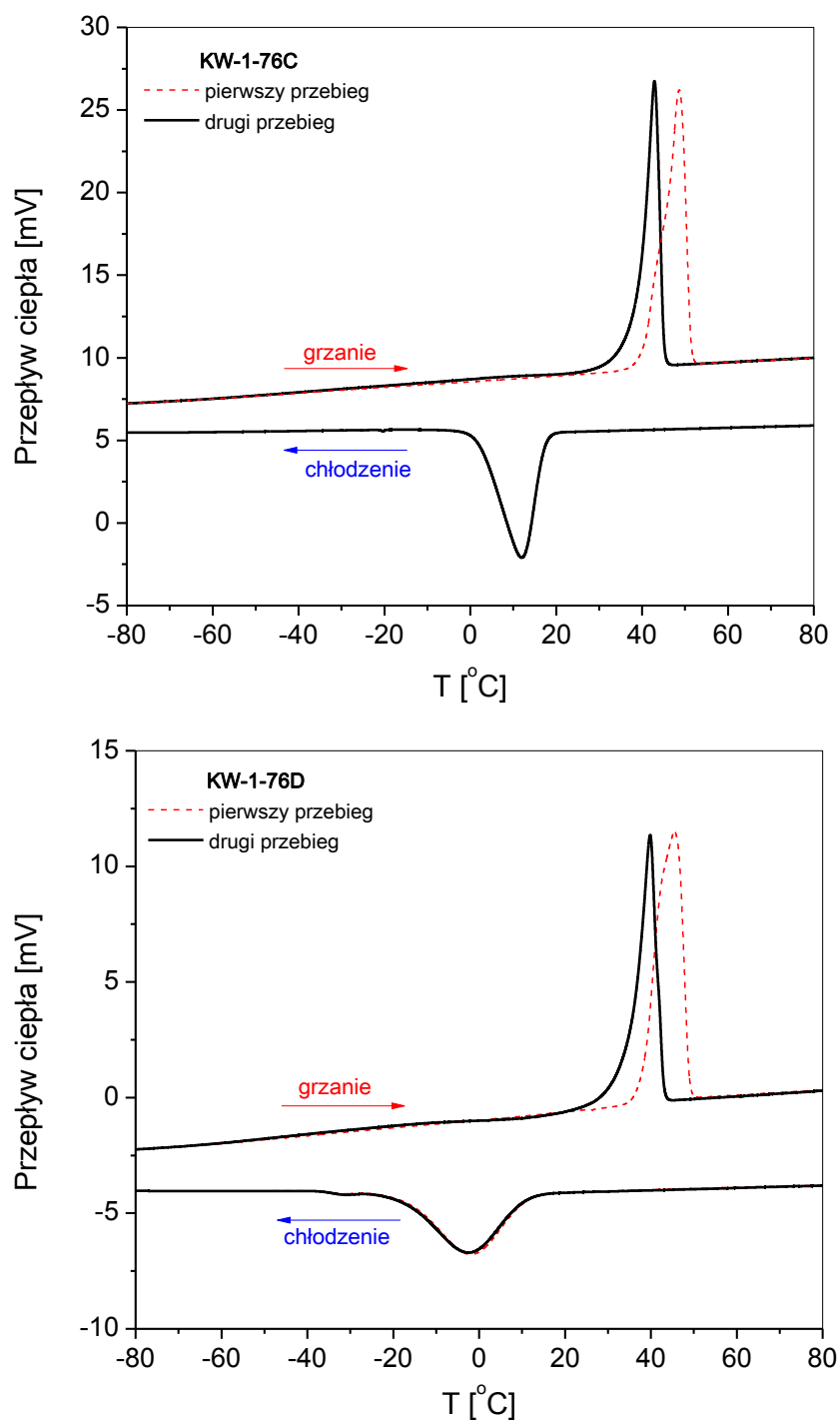
Udział fazy krystalicznej obliczono na podstawie wzoru [58]:

$$X_c = \frac{\Delta H}{\Delta H^{PEO}} \quad (8)$$

Gdzie ΔH^{PEO} oznacza entalpię topnienia dla całkowicie krystalicznego PEO (206.2 J/g), którą wyznacza się poprzez ekstrapolację (eksperymentalnej zależności entalpii krystalizacji ΔH od stopnia krystaliczności X_c polimeru) do wartości ΔH odpowiadającej polimerowi o 100% stopniu krystaliczności.



Rysunek 37 Termogramy zarejestrowane dla polimerów gwiaździstych w trybie grzania i chłodzenia, dla próbek KW-1-76A oraz KW-1-76B



Rysunek 38 Termogramy zarejestrowane dla polimerów gwiazdzystych w trybie grzania i chłodzenia, dla próbek KW-1-76C oraz KW-1-76D

Na termogramach (Rysunek 37 oraz Rysunek 38) widoczne jest, że dla każdego badanego polimeru wartość temperatury topnienia T_m w drugim przebiegu jest mniejsza. Na termogramach zarejestrowanych w trakcie chłodzenia odnotowano obecność dodatkowego, niewielkiego pik (wyraźnie widoczny po powiększeniu wykresu),

występującego w temperaturach znacznie poniżej T_c , wyraźnie zarysowanego w przypadku próbki KW-1-76D.

Tabela 6 Parametry wyznaczone na podstawie analizy termogramów DSC

	T_m [°C]	ΔH_m [J/g]	T_c [°C]	ΔH_c [J/g]	χ_c^{PEO} [%]
KW-1-76A	42.1	93.5	18.7	-86.3	45
KW-1-76B	41.1	89.9	17	-82.1	44
KW-1-76C	39.0	82.7	17	-75.2	40
KW-1-76D	35.3	70.0	11	-54.7	34

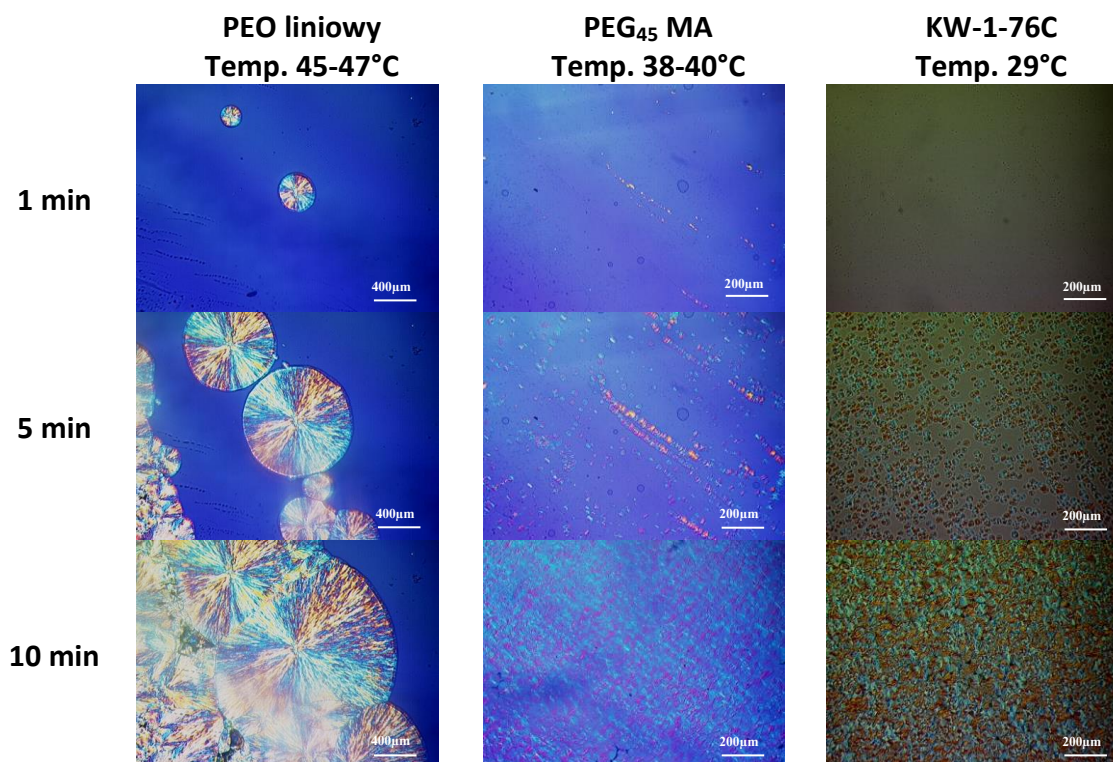
Obliczono również stopień krystaliczności ze wzoru (11), który jest najwyższy dla próbki KW-1-76A, a najniższy dla próbki KW-1-76D. Trzeba mieć jednak świadomość, iż obliczenia te mają charakter przybliżony, gdyż w przypadku tych obliczeń zaniedbujemy masę rdzenia i przyjmujemy, iż gwiazdy są całkowicie zbudowane z ramion PEO.

6.2.5 Techniki mikroskopowe w badaniach polimerów gwiazdzistych

6.2.5.1 Optyczna mikroskopia polaryzacyjna (POM)

Wykonano zdjęcia z zastosowaniem mikroskopii polaryzacyjnej dla liniowego PEO (o masie cząsteczkowej $M_n=10^4$), dla próbki KW-1-76C oraz dla substancji wyjściowej zastosowanej do syntezy badanych w tej pracy kationowych gwiazd polimerowych, którą był monomer PEG₄₅MA. Zdjęcia te zarejestrowano w trakcie krystalizacji wyżej wymienionych substancji w temperaturze około 10°C poniżej temperatury topnienia dla każdej z próbek. Wyniki przedstawiono na rysunku 39. Zdjęcia uzyskane dla stopionego polimeru (nie zostały zamieszczone w niniejszej pracy) przedstawiają polimer całkowicie przezroczysty, bez żadnych widocznych form krystalicznych. Natomiast pojawiające się koliste obiekty (już po minucie w przypadku liniowego PEO) są odzwierciedleniem powstających w próbce sferolitów. Dla liniowego PEO wraz z upływem czasu wyraźnie widoczny jest wzrost średnic sferolitów oraz wystąpienie obiektów różnej wielkości (spowodowane różnym czasem ich zainicjowania) dostrzegalne już po pięciu minutach od początku obserwacji. Po upływie 10 minut można zauważyć, iż brzegi sferolitów zaczynają się ze sobą stykać tworząc połączone ze sobą wielokątne figury z wyraźną granicą oddzielającą każdą z nich od pozostałych. Podobne zachowanie wykazują pozostałe próbki, jednakże w przypadku próbek PEG₄₅MA i KW-1-76C sferolity mają

zdecydowanie mniejsze rozmiary. Z kolei dla tych próbek proces krystalizacji przebiega bardzo szybko, gdyż po 10 minutach układy te są już całkowicie skryształizowane.



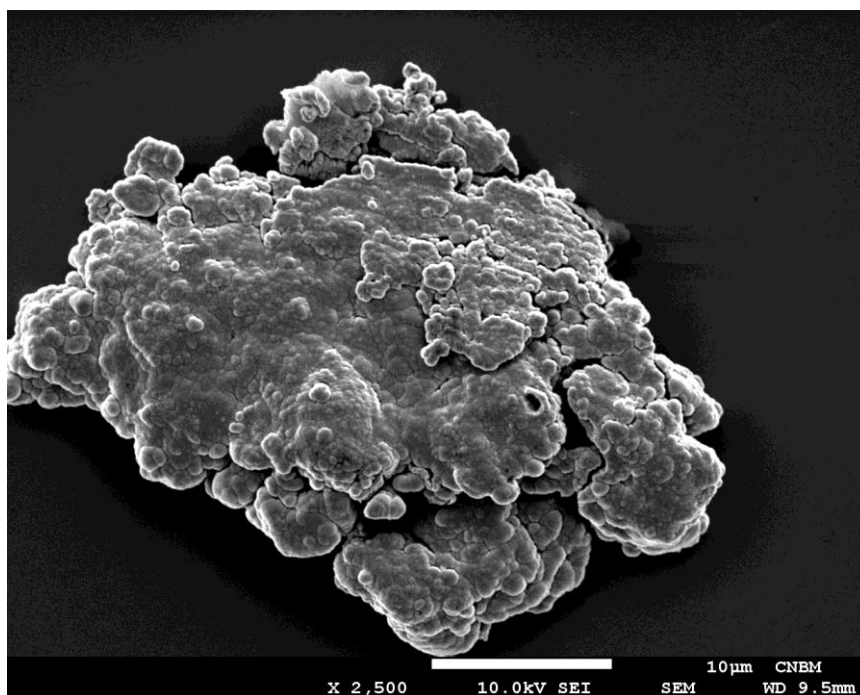
Rysunek 39 Zdjęcia wykonane z zastosowaniem POM obrazujące wzrost sferolitów, zachodzący w wyniku krystalizacji PEO

6.2.5.2 Skaningowa Mikroskopia Elektronowa (SEM)

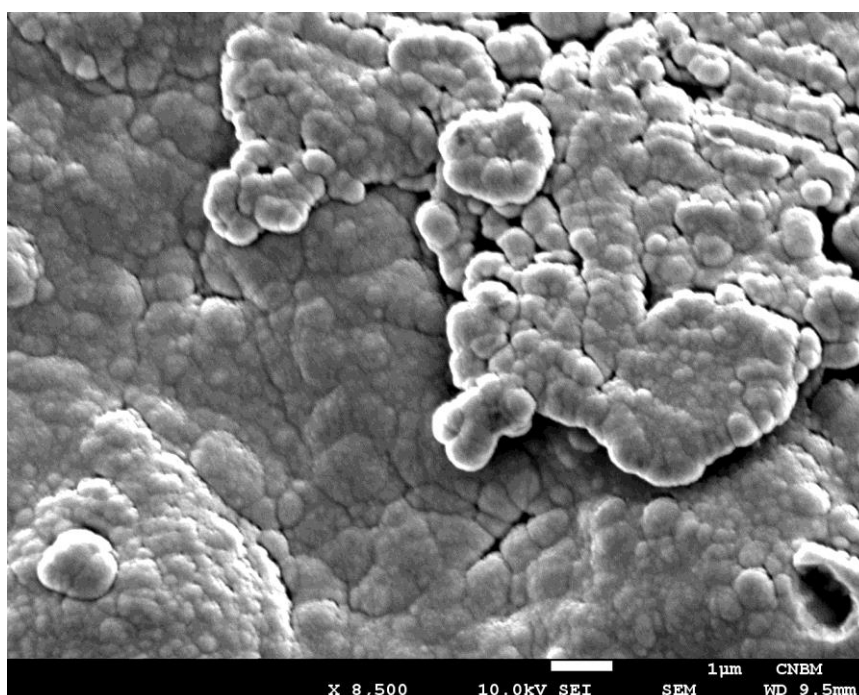
W celu oceny topografii oraz struktury polimerów gwiaździstych wykonano badania obrazowe za pomocą SEM, uzyskując informacje o strukturze i morfologii powierzchni badanych polimerów. Dla wszystkich polimerów wykonano szereg zdjęć z różnym powiększeniem. Na rysunkach 40 – 43, przedstawiających zdjęcia SEM wykonane dla próbki KW-1-76C, można zaobserwować kuliste obiekty. Podobne obrazy uzyskano dla pozostałych próbek, dlatego w niniejszej pracy zamieszczono zdjęcia powierzchni tylko dla jednego, wybranego polimeru. Wybór powiększenia dobrano tak, aby jak najlepiej uwidocznili charakterystyczną budowę badanych polimerów – od ujęcia powierzchni całego obiektu (agregatu) aż do obrazów struktur o rozmiarach nanometrycznych.

W przypadku próbek rozpuszczonych w wodzie, a następnie nałożonych na powierzchnię wafla krzemowego, obserwowano większe agregaty gwiazd. Wówczas gdy rozpuszczalnikiem był metanol uzyskano agregaty o mniejszych rozmiarach. Niestety, pomimo wytwarzania cienkich warstw roztworów polimerowych, przy użyciu metody „spin coatingu”, nie udało się uzyskać obrazów pojedynczych gwiazd.

Na rysunku 40 widoczny jest agregat o średnicy około $40\mu\text{m}$. Jednakże po 10-krotnym powiększeniu powierzchni polimeru (Rysunek 41) można zauważyć obecność w strukturze charakterystycznych kulistych kształtów. Prawdopodobnie obserwowane agregaty powstały w wyniku odparowania rozpuszczalnika wskutek skupiania się i łączenia molekuł polimerów gwiaździstych.

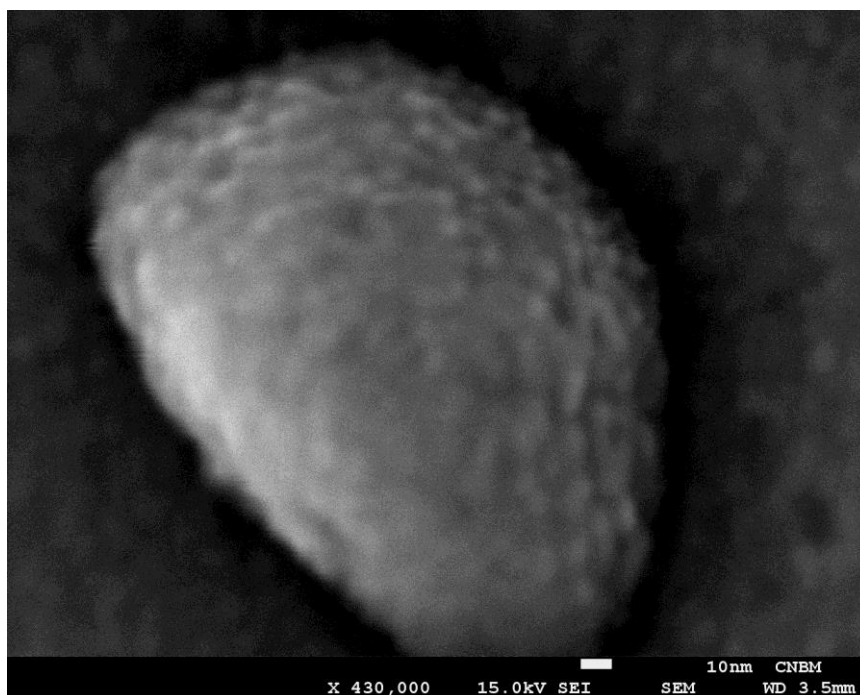


Rysunek 40 Zdjęcie SEM próbki KW-1-76C; powiększenie – 2,500 x (roztwór wodny)

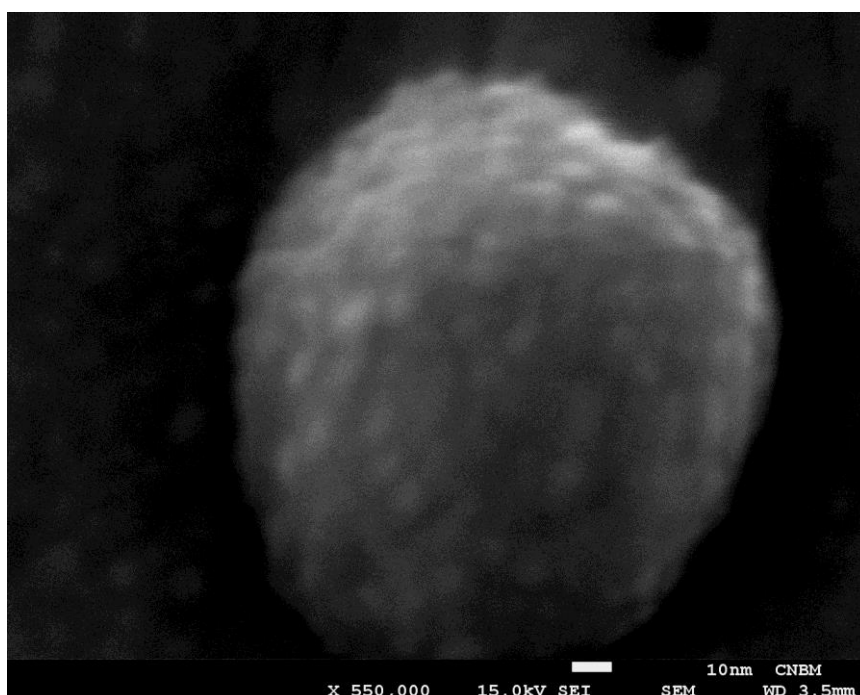


Rysunek 41 Zdjęcie SEM próbki KW-1-76C; powiększenie – 8,500 x (roztwór wodny)

Wówczas, gdy rozpuszczalnikiem jest metanol, który odparowuje znacznie szybciej niż woda, molekuly polimeru mają znacznie mniej czasu aby zorganizować się w większe skupiska, a w konsekwencji powstają agregaty o zdecydowanie mniejszych rozmiarach, rzędu 200 nm. Również w tym przypadku widoczne jest ukształtowanie powierzchni, które wyglądem przypomina strukturę piłeczki golfowej.



Rysunek 42 Zdjęcia SEM próbki KW-1-76C; powiększenie – 430,000 x (roztwór w metanolu)

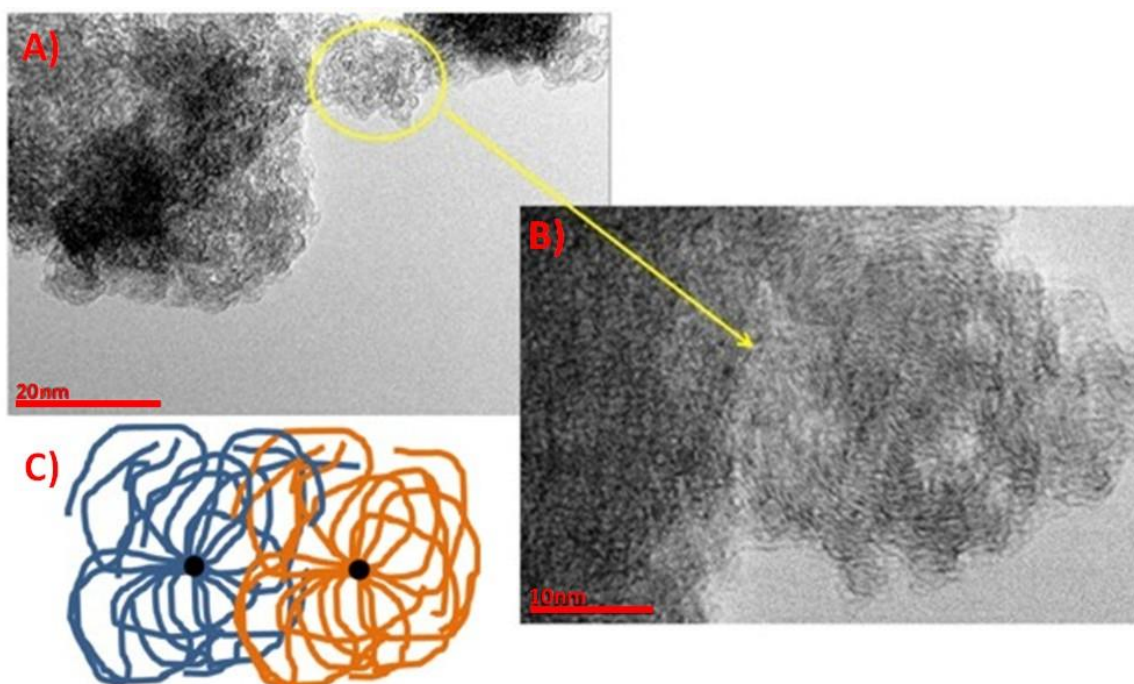


Rysunek 43 Zdjęcia SEM próbki KW-1-76C; powiększenie – 550,000 x (roztwór w metanolu)

Warto zauważyć, że tworzące ją kuliste elementy mają średnicę rzędu 10 nm. Taki rząd wielkości odpowiada rozmiarowi molekuł polimerów gwiaździstych, który wyznaczono na podstawie badań DLS, zatem można założyć, że obserwowany obiekt tworzą molekuly polimerowe połączone w jeden aglomerat.

6.2.5.3 Transmisyjna Mikroskopia Elektronowa (TEM)

Zdjęcia TEM próbki polimeru gwiaździstego KW-1-76C zamieszczono na rysunku 44 i rysunku 45. Przeprowadzono szereg prób, aby otrzymać jak najlepsze obrazy badanych układów. W tym celu nakrapiano roztwory gwiazd polimerowych na siatki do badań TEM, jak również wykorzystywano metodę „spin coatingu”. Najlepsze rezultaty uzyskano wówczas, gdy przygotowując preparat do badań, najpierw zanurzano siatkę węglową w roztworze polimeru, a następnie pozostawiano ją w osłoniętym miejscu do czasu odparowania rozpuszczalnika.



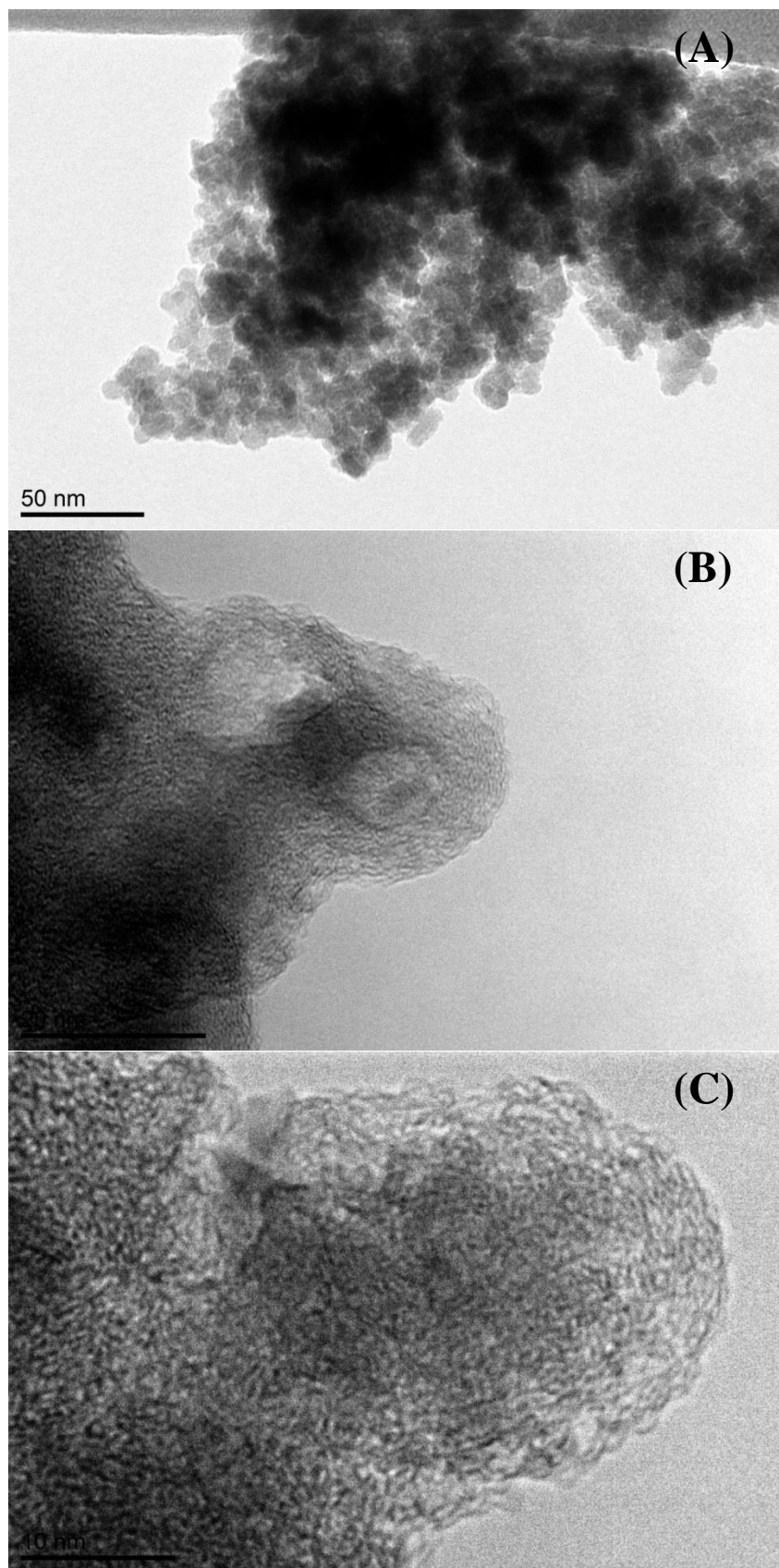
Rysunek 44 Obraz TEM próbki KW-1-76C (A), pojedynczego kłębka polimeru gwiaździstego (B) oraz schematyczne przedstawienie splątania gwiazd polimerowych (C)

W celu otrzymania obrazu pojedynczej gwiazdy polimerowej wykonano pomiary dla szeregu roztworów gwiazd polimerowych o różnych stężeniach. W zależności od stężenia roztworu wyjściowego badane układy wykazywały tendencję do występowania silniejszej lub słabszej tendencji do agregowania molekuł gwiazd polimerowych. W niniejszej pracy przedstawiono najlepsze obrazy TEM, które uzyskano dla badanych roztworów. Analiza

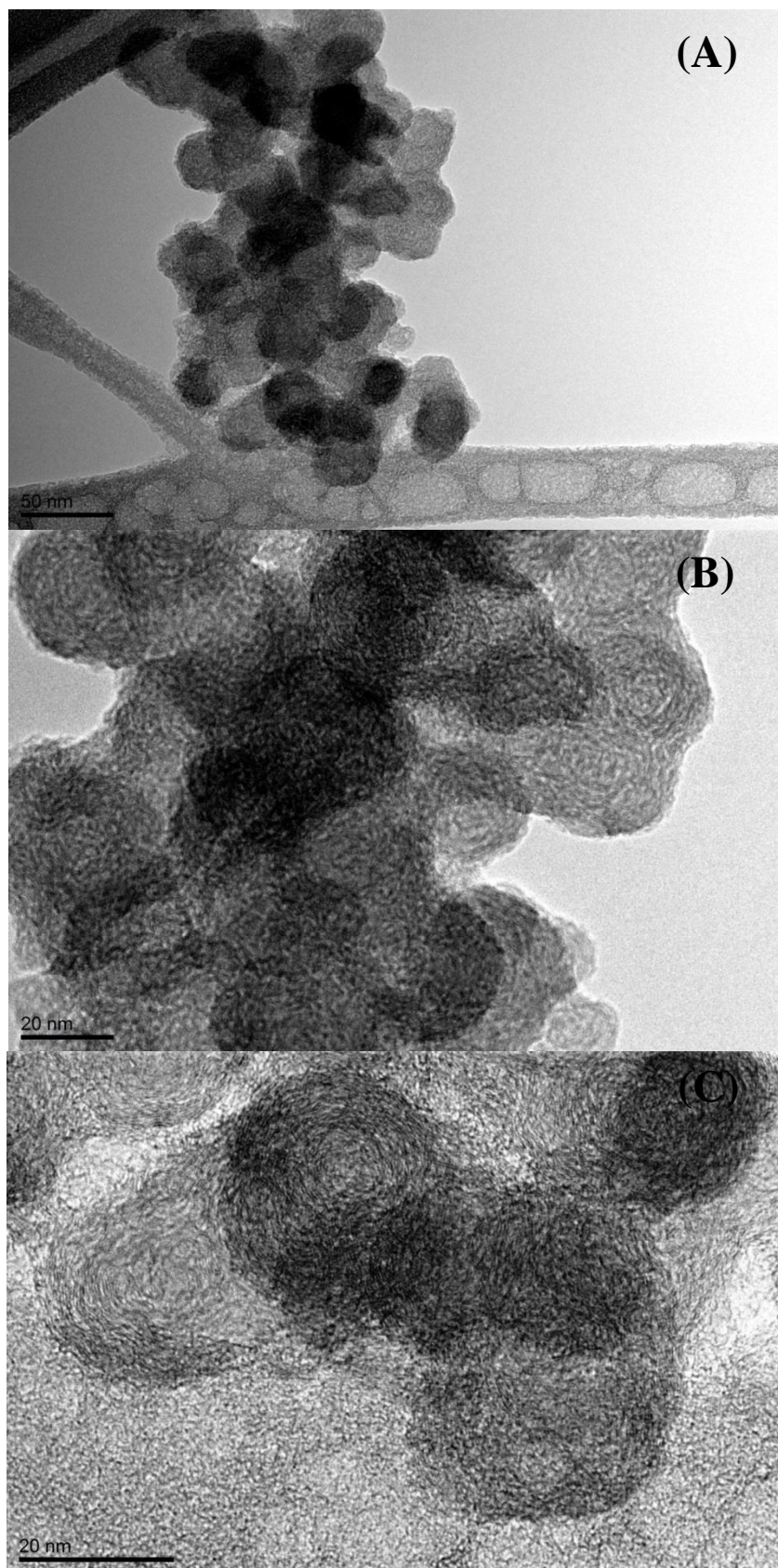
obrazu TEM przedstawionego na rysunku 44 wskazuje, że najprawdopodobniej ramiona gwiazd polimerowych po odparowaniu roztworu pozostają splątane, co uniemożliwia oglądanie pojedynczych molekuł. Agregaty gwiazd polimerowych wykazują strukturę podobną do tej, jaką posiada wata cukrowa (Rysunek 44 A) – na obrazie TEM można wyróżnić pojedyncze molekuły, mające postać kłębków (Rysunek 44 B), których ramiona najprawdopodobniej przenikają się wzajemnie (Rysunek 44 C).

Analiza obrazów TEM próbek otrzymanych z roztworu metanolu o wysokim stężeniu polimeru 10 mg/ml (Rysunek 45) wskazuje, że na skutek odparowania rozpuszczalnika otrzymano dość duże agregaty. Jednakże dla większych powiększeń zaobserwowano w strukturze układu małe obiekty kuliste o wielkości od 10 – 30 nm, które można zinterpretować jako pojedyncze cząsteczki gwiazd polimerowych. Najprawdopodobniej ze względu na silne oddziaływania pomiędzy ramionami (łańcuchami PEO) należącymi do sąsiednich gwiazd, następuje ich wzajemne przenikanie, prowadzące do wytworzenia skupiska molekuł bez wyraźnie zarysowanych granic pomiędzy poszczególnymi gwiazdami.

Wówczas gdy do badań użyto roztworów bardziej rozcieńczonych (Rysunek 46), to na powierzchni siatki, na którą został naniesiony polimer można było znaleźć wiele niewielkich agregatów przypominających skupiska małych kuleczek waty cukrowej. Jaśniejsza otoczka może być obrazem ramion gwiazd polimerowych. Pomimo, że polimery węglowodorowe charakteryzują się małym kontrastem, jednak na obrazach TEM widocznych na rysunkach 45 i 46, można wyodrębnić pojedyncze obiekty w postaci kulek o rozmiarach 10 – 20 nm, które najprawdopodobniej odpowiadają pojedynczym gwiazdom polimerowym.



Rysunek 45 Zdjęcie uzyskane z użyciem mikroskopu TEM dla roztworu polimeru gwiazdzistego KW-1-76C o stężeniu 10 mg/ml, przy rosnącym powiększeniu (A) – (C)



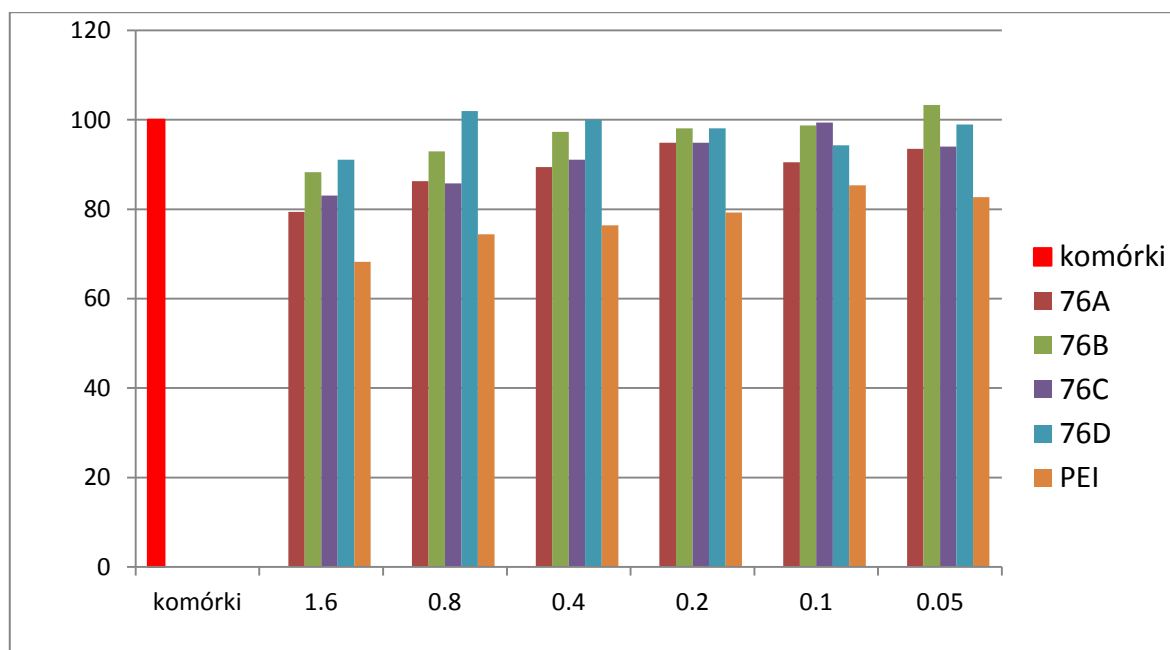
Rysunek 46 Zdjęcie uzyskane z użyciem mikroskopu TEM dla roztworu polimeru gwiaździstego KW-1-76C o stężeniu 0.2 mg/ml, przy rosnącym powiększeniu (A) – (C)

6.3 Badania biologiczne polimerów gwiaździstych

6.3.1 Cytotoksyczność

W celu określenia stopnia toksyczności zsyntetyzowanych związków wykonano test MTT. Poziom toksyczności badanych polimerów (KW-1-76A-D) wyznaczono przez porównanie toksyczności każdego typu polimeru gwiaździstego oraz polietylenoiminy (PEI). Ze względu na wysoką wydajność transfekcji, PEI jest uważana za „złoty” standard i jest często stosowana w badaniach porównawczych wprowadzania kwasów nukleinowych do komórki [132 – 133]. Badanie żywotności wykonano przez pomiar absorbancji roztworów za pomocą czytnika płytek (Tecan) przy długości fali 570 nm.

Żywotność komórek, w obecności określonego stężenia badanego polimeru, obliczono odnosząc odpowiednio, wartości absorbancji uzyskane dla poszczególnych stężeń badanych polimerów, do wartości absorbancji komórek kontrolnych, przyjmując absorbancję roztworu dla komórek kontrolnych za 100%. Uzyskane wyniki przedstawiono na rysunku 47.



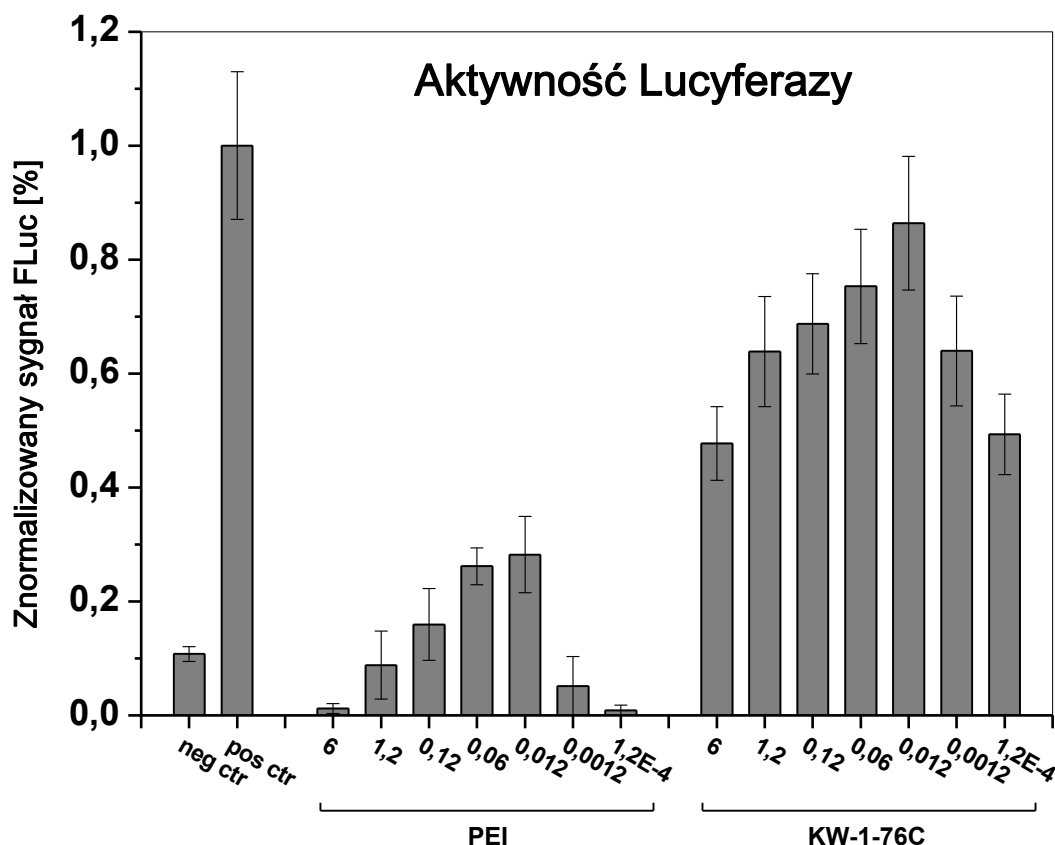
Rysunek 47 Zależność przeżywalności komórek od stężenia badanych polimerów określana w teście MTT

Wyniki wykonanego testu cytotoksyczności wykazały niską cytotoksyczność wszystkich badanych polimerów gwiaździstych. Należy podkreślić fakt, iż wszystkie badane próbki wykazują mniejszą toksyczność niż powszechnie stosowany związek jakim jest PEI [134]

w całym zakresie stężeń. To znaczy, że nie redukują przeżywalności komórek poniżej poziomu 80% w stosunku do komórek hodowanych w samym medium, bez dodatku polimeru. Można zauważyć, że właściwości toksyczne są zależne od stężenia polimeru. Najlepsze rezultaty uzyskano przy stężeniach z zakresu od 0.2 do 0.05 mg/ml, dla których przeżywalność komórek jest wyższa niż w przypadku stężeń z zakresu od 0.4 do 1.6 mg/ml. Ponadto polimer zawierający w swojej strukturze więcej kationowego składnika (KW-1-76D) wykazuje nieznacznie wyższą toksyczność od pozostałych, jednakże jest to toksyczność dopuszczalna w przypadku badań *in vitro*.

6.3.2 Transfekcja

Badania mające na celu określenie możliwości zastosowania polimeru gwiazdzistego jako wektora, zostały przeprowadzone za pomocą pomiaru poziomu ekspresji genu reporterowego lucyferazy (FLuc, pGL3-basic vector, Promega) z użyciem testu lucyferazy. Polipleksy utworzono przez połączenie polimeru gwiazdzistego KW-1-76C i reporterowego plazmidu (pDNA), po czym przeprowadzono ich transfekcję do komórek. Wyniki przeprowadzonego testu przedstawiono na rysunku 48. Słupki oznaczony na wykresie jako „pos ctr” oznacza poziom aktywności lucyferazy uzyskany po wprowadzeniu genu reporterowego za pomocą komercyjnie dostępnego czynnika transfekcyjnego jakim jest FuGENE HD. Słupki oznaczony „neg ctr” odpowiada poziomowi aktywności lucyferazy uzyskanemu przy braku systemu wspomagającego transfekcję. Słupki oznaczone jako 76 oraz PEI odpowiadają poziomom aktywności lucyferazy, uzyskanymi po transfekcji plazmidu, odpowiednio badanym polimerem KW-1-76C i polietylenoiminą (PEI). Badania wydajności transfekcji wykonane dla stężeń polimerów o wartościach z zakresu od $1.2 \cdot 10^{-4}$ mg/ml do 6 mg/ml pokazano na rysunku 48.

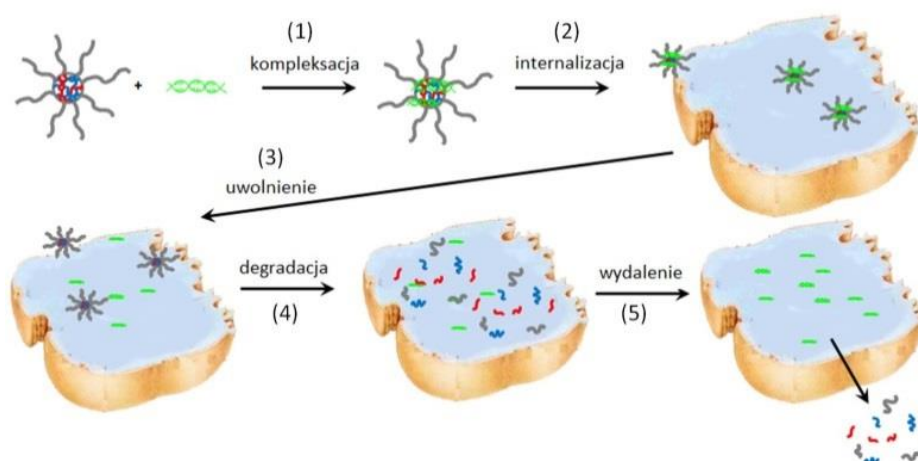


Rysunek 48 Wydajność transfekcji gwiazdy polimerowej KW-1-76C, tylko plazmid DNA (neg ctr, bez czynnika transfekującego), 20 ng plazmidu z FuGENE-HD (pos ctr), różne stosunki gwiazda/pDNA (76), oraz różne stosunki PEI/pDNA (PEI)

Według przeprowadzonych badań najlepszą wydajność transfekcji posiada polimer oznaczony jako KW-1-76C. Maksymalny poziom aktywności lucyferazy uzyskano w przypadku polipleksu utworzonego na bazie roztworu polimeru gwiazdzistego KW-1-76C o stężeniu 0.012 mg/ml. Zarówno przy stężeniach roztworów polimerowych wyższych, jak i niższych niż 0.012 mg/ml, obserwowano mniejszą skuteczność transfekcji wytworzonych polipleksów. Polimer gwiazdzisty KW-1-76C we wszystkich testowanych stężeniach wykazuje zdecydowanie lepszą zdolność transfekcji w porównaniu z PEI. Można zatem stwierdzić, że badane polipleksy wykazują dobrą zdolność transfekcji niezależnie od stężenia roztworu polimerowego użytego do ich wytworzenia.

7 DYSKUSJA WYNIKÓW

Polimery gwiaździste wydają się być obiecującą klasą materiałów, które w przyszłości mogą znaleźć zastosowanie jako nośniki leków i kwasów nukleinowych. Taka aplikacja wymaga jednak kompleksowej charakterystyki tych układów. Wśród ich zalet można wymienić dobrze zdefiniowaną strukturę, możliwość dopasowania ich rozmiarów odpowiednio do potrzeb danej aplikacji, stabilność i biokompatybilność. Polimery gwiaździste w swej geometrii przypominają dendrymery, jednakże są od nich tańsze i łatwiejsze w produkcji. Powiązanie ze sobą wszystkich parametrów idealnego wektora takich jak biokompatybilność, nietoksyczność, biodegradowalność, wysoka wydajność transfekcji oraz odpowiedni jego rozmiar jest niezwykle dużym wyzwaniem. Zbadanie właściwości materiałów polimerowych, które łączą w jednej nanocząsteczce wyżej wymienione cechy jest niezwykle istotnym etapem w procesie charakterystyki takich systemów, który zapewni wstępną analizę potencjalnego wykorzystania tych materiałów jako nośników leków w terapii różnego rodzaju chorób i wad genetycznych. Przeprowadzone w ramach niniejszej pracy badania zaprojektowanych i zsyntezowanych kationowych polimerów gwiaździstych, pozwoliły określić ich strukturę, właściwości oraz wytypować te z nich, które mają największe predyspozycje do wykorzystania w terapii medycznej w przyszłości.



Rysunek 49 Etapy, które powinien przejść wydajny wektor polimerowy (opis w tekście)

Polimery gwiaździste zostały zaprojektowane w ten sposób, aby pozwoliły na wydajne i nietoksyczne dostarczanie kwasów nukleinowych. Na rysunku 49 przedstawiono etapy,

które powinien przejść wektor polimerowy dostarczający kwasy nukleinowe, począwszy od jego kompleksacji z NA, aż do wydalenia produktów jego degradacji z organizmu.

Właściwości kationowe powinny zapewnić wektorowi polimerowemu zdolność kompleksacji z kwasami nukleinowymi na zasadzie elektrostatycznego oddziaływania (1). Dzięki ramionom PEO ochraniającym rdzeń przed środowiskiem zewnątrzkomórkowym, wektor jest biokompatybilny i może dostarczyć kompleks do komórki (2). W komórce następuje uwolnienie kwasu nukleinowego (3), a następnie degradacja materiału polimerowego (4) i jego wydalenie z komórki (5). Degradacja zaprojektowanych polimerów może być realizowana na przykład poprzez zrywanie mostków dwusiarczkowych pod wpływem czynnika redukującego (naturalnie występującego w komórkach) do rozmiarów cząsteczki ulegającej wydzieleniu na drodze klirensu nerkowego [135]. Podsumowując należy stwierdzić, że zsyntetyzowane układy powinny charakteryzować się następującymi właściwościami: zdolnością kompleksowania NA (enkapsulacji), biokompatybilnością i nietoksycznością oraz zdolnością do degradacji (po dostarczeniu NA).

7.1 Synteza i struktura polimerów gwiaździstych

Zaplanowano syntezę polimerów gwiaździstych o kowalencyjnie stabilizowanych rdzeniach i strukturach rdzeń/powłoka, posiadających bardziej stabilną strukturę w porównaniu z micelami i liposomami utworzonymi na bazie samoorganizujących się układów organicznych, którymi są np. środki powierzchniowo czynne czy też amfifilowe kopolimery blokowe [7]. W wyniku syntezy przeprowadzonej z zastosowaniem metody ATRP, uzyskano cztery układy polimerowe. Analiza wyników pomiarów chromatografii gazowej wykazała, że przereagowanie monomerów DSDMA oraz DMAEMA wyniosło około 80 – 98% w przypadku każdej z próbek. Wynik ten wskazuje, że zgodnie z założonym przebiegiem syntezy, dzięki obecności jednostek sieciujących DSDMA, cząstki polimerowe zawierają usieciowany rdzeń, który posiada właściwości kationowe w wyniku wprowadzenia do niego DMAEMA.

Masy cząsteczkowe zsyntetyzowanych polimerów (podane w tabeli 3 na str. 72) nie różnią się istotnie. Warto zauważyć, że średnie masy cząsteczkowe wyznaczone za pomocą chromatografii żelowej przy użyciu detektora RI (przyjmując dla badanych układów wartości z zakresu od $25.9 \cdot 10^3 \text{ g/dm}^3$ do $26.9 \cdot 10^3 \text{ g/dm}^3$) są dwu lub trzykrotnie niższe od tych otrzymanych dla w/w układów przy użyciu detektora MALLS (o wartościach z zakresu od $80.6 \cdot 10^3 \text{ g/dm}^3$ do $98.2 \cdot 10^3 \text{ g/dm}^3$). Różnice w wartościach

mas cząsteczkowych, wyznaczonych z zastosowaniem tych dwóch różnych detektorów, wynikają z tego, że przy wyznaczaniu masy cząsteczkowej z użyciem detektora MALLS, uwzględniane są kuliste kształty polimerów gwiaździstych, natomiast w standardowej chromatografii żelowej kalibrację wykonuje się dla polimeru liniowego, którym zwykle jest standardowo używany polistyren [136]. Pomiar wykonany z zastosowaniem chromatografii żelowej wykazały, że wszystkie cztery zsyntezowane polimery, różniące się zawartością kationowego składnika w wyjściowej mieszaninie, charakteryzują się niską polidispersyjnością ($M_w/M_n \leq 1.28$).

Na podstawie badań przeprowadzonych przy użyciu chromatografii żelowej i gazowej, dla zsyntetyzowanych polimerów wykazano, że układy te wykazują nieznaczne różnice w średniej liczbie ramion PEG₄₅MA, przypadających na jedną molekułę polimeru gwiaździstego, która dla badanych układów mieści się w zakresie od 33 do 42.

Analiza widm ¹H NMR wodnych roztworów polimerów gwiaździstych potwierdziła, że w wyniku syntezy uzyskano planowaną strukturę molekuł polimerowych, zawierających rdzeń, w którym znajduje się crosslinker z mostkiem dwusiarczkowym, i przyłączonych do niego kowalencyjnie długich ramion PEG oraz krótkich ramion kationowego DMAEMA. Możliwość swobodnego poruszania się ramion PEG w roztworze potwierdzają wąskie protonowe linie rezonansowe uzyskane dla grup –CH₂O– oraz grup –CH₃, natomiast dla protonów tych grup, które zostały w trakcie polimeryzacji uwięzione w rdzeniu polimeru gwiaździstego, odnotowano znaczne poszerzenie linii NMR. Linia rezonansowa protonów grup –CH₂ w łańcuchu głównym PEG jest poszerzona u podstawy, co może wynikać z faktu, że te grupy –CH₂, które znajdują się blisko rdzenia mają ograniczoną mobilność. Sygnały charakterystyczne dla protonów poszczególnych grup DMAEMA [137 – 138] tj. grup –CH₃ znajdujących się na końcu łańcucha, grup –CH₂O– oraz –CH₂N– znajdujących się w łańcuchu głównym, w przypadku próbek KW-1-76C i D, cechuje znaczne poszerzenie, co świadczy o ograniczeniu ich ruchliwości, najprawdopodobniej wskutek ich uwięzienia w rdzeniu gwiazdy. Mimo swoistego unieruchomienia mogą one spełniać swoje zadanie, umożliwiając elektrostatyczne oddziaływanie pomiędzy ujemnie naładowanymi kwasami nukleinowymi a rdzeniem gwiazdy. Dla próbek KW-1-76A i B linie rezonansowe protonów pochodzących od grup –CH₃ znajdujących się na końcach łańcuchów DMAEMA oraz grup –CH₂ znajdujących się przy azocie, wykazują dwuskładnikowy charakter (są poszerzone u podstawy), co wskazuje na to, że tylko część tych grup pozostaje uwięziona w rdzeniu, a pozostałe mają możliwość swobodnego ruchu. Większą mobilność w/w grup, w przypadku próbek KW-1-76A i B, w porównaniu

z KW-1-76C i D, można wytłumaczyć wyższą zawartością crosslinkera i tylko niewielką ilością DMAEMA w rdzeniu gwiazdy, co może być spowodowane wbudowaniem DMAEMA tylko na obrzeżach rdzenia w przypadku tych pierwszych. Powyższe obserwacje potwierdzają, że wszystkie reagenty zostały wkomponowane do molekuly polimeru gwiazdzistego, która składa się ze sztywnego rdzenia oraz mobilnych łańcuchów PEG, które są do niego przyłączone.

Na podstawie badań DLS wyznaczono rozmiary molekuł zsyntezowanych polimerów gwiazdzistych. Średnica nanocząsteczek nie wykazuje istotnej zależności od zawartości kationowego składnika i liczby ramion, a jej wartość mieści się w zakresie od 8.98 do 10.83 nm. Przepuszczalnie można to tłumaczyć zwiększeniem upakowania rdzenia gwiazdy wraz ze wzrostem zawartości kationowego składnika, na co wskazują wyniki badań ^1H NMR.

7.2 Krystaliczność polimerów

Polimery gwiazdziste mogą być stosowane jako wektory do dostarczania kwasów nukleinowych, przy czym modyfikacja może umożliwić inne ich zastosowania (np. do dostarczania leków czy innych substancji terapeutycznych). Znalezienie najodpowiedniejszej metody dostarczenia tychże wektorów do komórek i obserwacja ich zachowania przed aplikacją, zwłaszcza w przypadku polimerów zbudowanych w dużej mierze z PEG, który jest wysoce krystalicznym polimerem [139], wymaga sporządzenia ogólnej charakterystyki zarówno fizykochemicznej, jak i biologicznej tego rodzaju systemów jako układów modelowych. Pomiar krystaliczności polimerów dostarcza również cennych informacji dla badań materiałowych, jak i dla kontroli jakości w procesie przetwarzania materiałów.

Czynnikami wpływającymi na krystalizację polimerów i ich stopień krystaliczności są na przykład liniowość łańcucha polimerowego, obecność więcej niż jednego typu monomeru oraz układ grup bocznych na szkielecie [140]. Parametry takie jak stopień krystaliczności polimeru, rozkład wielkości krystalitów, szybkość powstawania kryształu oraz parametry określające oddziaływanie polimer – woda są istotne w przypadku uwalniania leków. Szybkość uwalniania leków z materiałów polimerowych jest bowiem kontrolowana przez transformację fazy krystalicznej do fazy amorficznej. Obszary krystaliczne w polimerze są uważane za struktury nieprzepuszczalne, które nie pozwalają na dyfuzję leku. Tak więc lek jest uwalniany gdy polimer pęcznieje. Wówczas gradient stężenia dla dyfuzji leku zmniejsza się. Jednakże równocześnie zanik fazy krystalicznej

powoduje wzrost dyfuzji leku z polimeru. Dlatego też semikrystaliczne polimery, które w trakcie ich rozpuszczania pozwalają na kontrolowane uwalnianie leków są wysoce pożądane [140]. W związku z powyższym w niniejszej pracy przeprowadzono badania mające na celu scharakteryzowanie struktury fazowej badanych układów polimerowych o strukturze gwiaździstej.

Pierwszym etapem charakterystyki procesów krystalizacji badanych układów było wyznaczenie parametrów termodynamicznych przejść fazowych oraz stopnia krystaliczności otrzymanych polimerów gwiaździstych na podstawie analizy badań kalorymetrycznych. Wraz ze wzrostem składnika kationowego, poczynając od próbki KW-1-76A aż do próbki KW-1-76D, zaobserwowano stopniowe zmniejszanie się wartości temperatury krystalizacji (od 18.7°C do 11°C) i topnienia (od 42.1°C do 35.3°C) (Tabela 6), czemu towarzyszyło poszerzanie się pików związanych z tymi procesami. Ponadto stwierdzono, że wraz ze wzrostem zawartości kationowego składnika zmniejszeniu ulega stopień krystaliczności polimeru gwiaździstego (od 45% dla KW-1-76A do 34% dla KW-1-76D). Na potrzeby dyskusji wyników wykonano również badania kalorymetryczne dla liniowego PEO o masie cząsteczkowej 10^4 g/dm³, które pozwoliły określić jego stopień krystaliczności (86.5%) oraz temperatury topnienia i krystalizacji ($T_m = 57.2$ °C; $T_c = 42.5$ °C). Należy podkreślić, że dla układów o strukturze gwiaździstej wyraźnie jest pogorszenie parametrów procesu krystalizacji objawiające się ich mniejszym stopniem krystaliczności oraz niższymi wartościami temperatur krystalizacji i topnienia w porównaniu z liniowym PEO. Wiadomo, że struktura polimeru wpływa na stopień krystaliczności i wówczas gdy jest ona regularna i uporządkowana, to tworzenie kryształów zachodzi łatwiej [141]. Polimery liniowe mają mniejsze przeszkody przestrzenne dla procesu krystalizacji, dlatego nie wykazują tak skomplikowanego procesu związanego z krystalizacją, charakteryzują się większym udziałem fazy krystalicznej i większymi rozmiarami krystalitów, co prowadzi do przesunięcia temperatur topnienia i krystalizacji ku wyższym temperaturom w porównaniu z polimerami o tej samej budowie chemicznej, lecz bardziej złożonej architekturze [142]. Obniżenie stopnia krystaliczności w porównaniu z liniowym PEO obserwowano również Mya i in. [143] dla PEO o strukturze gwiaździstej z rdzeniem POSS. Utrudniona krystalizacja układów gwiaździstych jest spowodowana zatem ich architekturą tj. kulistą budową przestrzenną, co sugeruje również Lapienis [144]. Skomplikowana budowa badanych układów (rdzeń – powłoka) i stąd mały stopień upakowania powodują, że układ taki potrzebuje więcej czasu aby osiągnąć stan uporządkowania. Obserwowano dla wszystkich polimerów większa wartość entalpii

topnienia w porównaniu z entalpią krystalizacji również wskazuje na utrudnienia występujące w procesie krystalizacji i jest najprawdopodobniej związana ze złożonością badanych układów. Stopniowe zmniejszanie się stopnia krystaliczności oraz obniżanie wartości temperatur krystalizacji i topnienia odnotowano również jako skutek stopniowego wzrostu udziału składnika kationowego. Najprawdopodobniej głównym powodem tej tendencji jest wzrost stopnia usieciowania rdzenia występujący wraz ze wzrostem udziału składnika kationowego, prowadzący do większej separacji między łańcuchami PEO w obrębie molekuly. Wzrost stopnia usieciowania oznacza mniejszą ruchliwość elementów rdzenia, co wpływa na zmniejszenie mobilności łańcuchów PEO. Z kolei poszerzenie pików krystalizacji, zwiększające się wraz ze wzrostem kationowego charakteru próbek, można najprawdopodobniej tłumaczyć zwiększeniem niejednorodności układu przez zwiększenie udziału rdzenia w cząsteczce gwiazdy polimerowej. Ponadto, dodatkowe niewielkie piki, widoczne na termogramach zarejestrowanych w trakcie chłodzenia (widoczne po powiększeniu wykresu), występujące w temperaturach znacznie poniżej T_c (najwyraźniej zarysowane w przypadku próbki KW-1-76D), wskazują na obecność dodatkowych procesów krystalizacji i świadczą o dużym skomplikowaniu układu. Występowanie tych dodatkowych procesów wynika najprawdopodobniej ze zmian wielkości i kształtu powstających krystalitów w porównaniu z liniowym PEO, co obserwowali również Pagacz i inni. [145]. Warto też zwrócić uwagę na szerokie piki topnienia i krystalizacji, które są charakterystyczne dla układów częściowo krystalicznych, a które mają bezpośredni związek z rozkładem wielkości krystalitów [146]. Powyższe obserwacje są zgodne z doniesieniami literaturowymi odnośnie wpływu struktury ramion, ich ilości i długości oraz obecności grup końcowych na parametry termiczne [76, 147].

Kolejnym krokiem w charakterystyce procesów krystalizacji było zbadanie wzrostu sferolitów w układach polimerów gwiazdzistych z zastosowaniem mikroskopii polaryzacyjnej. W procesie krystalizacji można wyróżnić fazę zarodkowania i fazę wzrostu sferolitów. W pierwszym etapie krystalizacji ma miejsce tworzenie się zarodków krystalicznych, a następnie łańcuchy układają się stycznie do siebie i zestalone regiony rosną promieniście w postaci sferolitów. Sferolity posiadają charakterystyczną dla nich symetrię kulistą w początkowej fazie wzrostu, jednak gdy osiągną odpowiednio duże rozmiary, tak że zaczynają zderzać się i łączyć się ze sobą, wtedy ich brzegi przyjmują kształt wielokątny.

Obserwowane dla próbki PEO istnienie szerokiego rozkładu wielkości nielicznych sferolitów w początkowej fazie ich wzrostu, sugeruje sporadyczne pojawianie się

zarodków. Obrazy otrzymane dla czystego PEO odpowiadają sferolitom, które wykazują wyraźną cechę krzyża maltańskiego. Obserwowany typ krzyża maltańskiego jest charakterystyczny dla sferolitów PEO w przypadku jego krystalizacji w reżimie II [148]. W przypadku próbek monomeru PEG₄₅MA i polimeru o strukturze gwiaździstej można zauważyć, że w początkowej fazie sferolity różnią się wielkością, jednak wszystkie mają kształt kulisty. Ponadto zaobserwowano istotny spadek wielkości rozmiarów sferolitów powstałych w wyniku krystalizacji polimeru gwiaździstego w porównaniu z tymi, które obserwowano dla liniowego PEO. W przypadku układów gwiaździstych ten efekt wynika z jednoczesnego powstawania dużej liczby zarodków, co prowadzi do wytworzenia sferolitów o znacznie mniejszych rozmiarach niż w przypadku liniowego PEO. Mya i inni [143] na podstawie analizy badań przeprowadzonych dla PEO o strukturze gwiaździstej z rdzeniem POSS sugerują, że rdzeń polimeru gwiaździstego może służyć jako środek zarodkujący. Spitael i in. [149] wskazuje w swojej pracy na możliwość użycia kopolimerów jako środków zarodkujących. Polimery gwiaździste są swoistymi kopolimerami, co może wyjaśniać zwiększenie liczby nukleantów, powstających w tych układach, w stosunku do liniowego PEO, co skutkuje mniejszymi rozmiarami ich sferolitów. Podobnie można wytłumaczyć zmniejszenie wielkości sferolitów, obserwowane w przypadku liniowego PEG₄₅MA (użytego do utworzenia ramion gwiazdy) w porównaniu do liniowego PEO, jako spowodowane obecnością grupy metakrylowej, która może stanowić środek zarodkujący w tym układzie [150].

7.3 Dyfuzja

Dyfuzja cząstek polimeru w roztworze różni się znacznie od dyfuzji niskomolekularnych cieczy. W szczególności, polimery o dużej masie cząsteczkowej lub rozbudowanej architekturze cząsteczki, z wieloma rozgałęzionymi łańcuchami bocznymi (np. gwiazdy polimerowe), przejawiają nie-newtonowskie własności transportu [151]. Polimery gwiaździste, zawierające w swojej cząsteczce wiele ramion (f), z których każde zbudowane jest z N_a monomerów połączonych kowalencyjnie w jednym wspólnym punkcie, są od lat modelowym układem badanym w celu zrozumienia dynamiki polimerów rozgałęzionych [152]. Jednym z narzędzi do tego typu badań są pomiary współczynników dyfuzji translacyjnej D . Dyfuzja klasycznych polimerów w niskomolekularnych rozpuszczalnikach, w zakresie stężenia polimeru $c^* < c < c^{**}$ jest zależna od jego masy cząsteczkowej M_w z wykładnikiem β . Oryginalną teorię dyfuzji polimerów w roztworach sformułował Flory [153], która opisuje zależność współczynnika dyfuzji molekuł polimeru

od lepkości i mocy rozpuszczalnika, temperatury itp. Współczynniki dyfuzji obliczone z uwzględnieniem w/w parametrów są zgodne dla szerokiej klasy polimerów z wartościami uzyskiwanymi eksperymentalnie. Współczynniki dyfuzji rozgałęzionych polimerów, w tym gwiazd polimerowych, są proporcjonalne do wyrażenia $\exp(\alpha(f - 2)N_a)$, w którym α jest stałą, f ilością ramion polimeru, a N_a ilością monomerów tworzących ramię gwiazdy [154 – 155]. Jednakże, jak wiadomo z eksperymentów pomiaru współczynników dyfuzji przeprowadzonych przez Kleina [156], ostatnia zależność może zostać uproszczona do postaci $\exp(-0.41f)$. Jak wspomniano powyżej, współczynniki dyfuzji translacyjnej w zależności Flory'ego są skalowane masą molekularną M_w lub przez ilość monomerów N_a tworzących ramię gwiazdy, zależność ta jest prawdziwa niezależnie od kształtu cząsteczki polimeru (liniowa lub rozgałęziona). Zależność współczynników dyfuzji od masy molekularnej jest dobrze udokumentowana eksperymentalnie i opisana w literaturze [157]. Współczynniki dyfuzji polimerów gwiazdzistych zsyntetyzowanych w ramach niniejszej pracy i zmierzonych przy użyciu techniki DOSY opisanej w rozdziale 4.1.2, pozostają w zgodzie z wynikami Vlassopoulou i innych [158] uzyskanych przy zastosowaniu symulacji komputerowych i pomiarów współczynników dyfuzji gwiazd polimerowych o różnej ilości ramion.

Bardzo użyteczną, w przypadku badań dyfuzji makrocząsteczek (polimerów) w roztworach, jest zależność Einsteina-Stockesa wiążąca współczynnik dyfuzji D dyfundującej cząsteczki z jej promieniem hydrodynamicznym R_h . W najprostszym przypadku modelu hydrodynamicznego, makrocząsteczka dyfunduje w rozpuszczalniku o lepkości η , traktowanym jak ośrodek ciągły. Korzystając z powyższego modelu wyznaczono promienie hydrodynamiczne gwiazd polimerowych i przedstawiono je w tabeli 4. Porównanie ich wartości z wynikami uzyskanymi metodą DLS potwierdza 10 nm średnicę gwiazd. Niewielka zależność współczynnika D od zawartości kationowego składnika, widoczna w tabeli 4 może być efektem kontrakcji elektrostatycznej łańcuchów PEG w sąsiedztwie rdzenia i prowadzi do zmian konformacyjnych ramion. Efektywna średnica gwiazdy ulega redukcji, co znajduje odzwierciedlenie w wartościach promieni hydrodynamicznych gwiazd widocznych w tabeli 4. Wielkość gwiazd polimerowych w aplikacjach biomedycznych jest kluczowym parametrem, decydującym o powodzeniu dostarczenia NA do komórek, z których następnie niepotrzebne już polimery są usuwane. Wielkość gwiazdy polimerowej jako nośnika NA musi zawierać się w ściśle określonych granicach by zapewnić projektowaną funkcjonalność i aktywność biologiczną.

Bardzo istotna jest również ruchliwość gwiazd polimerowych jako środków transportujących materiał genetyczny do komórki. Obydwa w/w czynniki tj. wielkość i jonowość nośników decydują o możliwości przenikania przez błonę komórkową, natomiast ruchliwość nośników przekłada się na efektywność transportu do wnętrza. Informację o stochastycznym, aktywowanym termicznie ruchu cząsteczki zawiera współczynnik dyfuzji D , który opisuje jej średniokwadratowe przemieszczenie w jednostce czasu. Zmierzone wartości współczynników dyfuzji gwiazd polimerowych są porównywalne do współczynników dyfuzji biopolimerów aktywnych, co gwarantuje wystarczającą ruchliwość nośników [159].

7.4 Kationowość

N,N-metakrylan dimetyloaminoetylu (DMAEMA) jest rozpuszczalnym w wodzie, jednofunkcyjnym monomerem akrylanowym, zawierającym polarną, trzeciorzędową grupę aminową, zapewniającą rozpuszczalność w wodzie i doskonałe właściwości adhezyjne. Użycie powyższego monomeru pozwala na uzyskanie kationowych właściwości gwiazdy polimerowej, a tym samym na wprowadzenie ładunku umożliwiającego kompleksację polimeru gwiaździstego z kwasami nukleinowymi [160]. Przeprowadzone syntezy pozwoliły wyznaczyć stężenia molowe reagentów, dla których uzyskuje się polimery o strukturze gwiaździstej z rdzeniem o charakterze kationowym. Na podstawie pomiaru potencjału zeta wykazano, że próbki KW-1-76B, C i D posiadają dodatnie wartości tego potencjału dzięki odpowiednio wysokiej zawartości kationowego monomeru, w odróżnieniu od próbki KW-1-76A dla której uzyskano ujemną jego wartość, co spowodowane jest najprawdopodobniej zbyt małą zawartością kationowego składnika, na co wskazuje również analiza widm ^1H NMR. Przyłączanie łańcuchów PEG do rdzenia polimerów kationowych poprawia wydajność dostarczania kwasów nukleinowych i sprzyja stabilizacji tych kompleksów oraz przeciwdziała agregacji. Wprowadzenie warstwy PEG pozwala również obniżyć barierę adhezyjności i w ten sposób zwiększa wychwyty komórkowy polimeru kationowego. Obecność ramion PEG może również powodować zmniejszenie siły kompleksacji pomiędzy kationowym rdzeniem i kwasami nukleinowymi, co może być uważane za korzystne dla bardziej skutecznego uwalniania NA w komórkach.

7.5 Biodegradowalność

Możliwość syntezy polimerów o różnym stopniu upakowania rdzenia jest niezwykle cenna dla projektowania materiałów o kontrolowanym rozkładzie (biodegradowalności),

właściwościach uwalniania NA (czy też leków) oraz biokompatybilności. Gwiazdy o bardziej usieciowanej strukturze rdzenia potrzebują więcej czasu na przejście procesów degradacji, zatem kontrolowanie stopnia upakowania rdzenia umożliwia w pośredni sposób regulację szybkości i miejsca degradacji rdzenia w organizmie, co decyduje o uwolnieniu przenoszonego w jego rdzeniu materiału genetycznego (czy leku). Taką kontrolę uzyskuje się również, gdy do budowy rdzenia zostanie użyty inny składnik wrażliwy np. na zmianę pH [161].

PEG jest biokompatybilnym, rozpuszczalnym w wodzie polimerem, stosowanym szeroko jako nośnik do dostarczania genów [162]. PEGylowane nośniki polimerowe zmniejszają enzymatyczną degradację, a zatem wymagają chemicznie usieciowanego szkieletu dla degradacji *in vivo*. W związku z powyższym, w celu stworzenia polimerowych układów degradujących, zastosowano jedno z możliwych rozwiązań polegające na wprowadzeniu dwusiarczkowego środka sieciującego, który będzie degradował w warunkach redoks [163 – 164]. Uzasadnieniem produkcji polimerów z wiązaniami dwusiarczkowymi jako elementami sieciującymi jest wytworzenie materiałów, które ulegają kontrolowanej biodegradacji i w ten sposób mogą uzyskać zakładane, pożądane właściwości biologiczne i terapeutyczne [165 – 166]. Układy zawierające wiązania dwusiarczkowe są jednymi z powszechnie używanych układów sieciujących. Dzięki obecności glutationu (GSH), najbardziej rozpowszechnionego i najobfitszego tiolu, a zarazem buforu wewnątrzkomórkowego występującego w ludzkim biosystemie, w cytoplazmie komórkowej jest generowane i utrzymywane silne środowisko redukcyjne. W związku z tym, że stężenie zredukowanej formy glutationu jest 500 – 1000 razy większe niż jego postaci utlenionej [167], większość wiązań dwusiarczkowych jest szybko rozkładanych na drodze dwusiarczkowej reakcji wymiany z postacią zredukowaną glutationu po jego penetracji do cytoplazmy [168]. Dlatego też polimerowe systemy dostarczania usieciowane wiązaniami dwusiarczkowymi są dość stabilne w ich utlenionej formie w środowisku pozakomórkowym, ale ulegają rozkładowi po ich dostarczeniu do komórek [39].

Za pomocą metody DLS określono wielkość molekuł polimerowych po 24 godzinach inkubacji cząstek polimerowych znajdujących się w roztworze z GSH. Wyniki tych badań wykazały zmniejszenie wielkości cząsteczek w stosunku do wyjściowego roztworu, co sugeruje, że rdzeń z polimerów gwiazdzistych został zdegradowany do pojedynczych łańcuchów polimerowych. Dla badanych polimerów gwiazdzistych, z wyjątkiem próbki KW-1-76A, nie zaobserwowano procesów agregacji zdegradowanych fragmentów

polimerów. Agregacja była obserwowana dla próbki, która zawiera największą liczbę grup tiolowych (powstających w wyniku redukcji mostków dwusiarczkowych), które mogą podlegać procesowi żelowania [169].

7.6 Cytotoksyczność

Systemy oparte na DMAEMA były proponowane już wcześniej, jako potencjalne nośniki dla dostarczania genów, ze względu na ich kationowe właściwości, jednakże ich możliwa cytotoksyczność była kluczowym problemem [170 – 171]. W niniejszej pracy zsyntezowano polimery gwiazdziste z DMAEMA włączonym do rdzenia, który jest chroniony przez zewnętrzne ramiona PEG, zwiększające biokompatybilność i chroniące komórki przed szkodliwymi właściwościami kationowymi polimeru [172]. Efekt ten uzyskano dzięki znanemu w literaturze i szeroko opisanemu efektowi PEGylacji [173 – 174].

Testy cytotoksyczności potwierdziły, że polimery gwiazdziste są biokompatybilne i nie wpływają w znaczący sposób na żywotność komórek w stężeniach 1.6, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1 i 0.05 mg/ml. Co więcej, wykazują mniejszą cytotoksyczność w badanych stężeniach nawet w porównaniu do „złotego” standardu jakim jest PEI. Warto zauważyć, że ani kationowy ładunek powierzchniowy, ani ciężar cząsteczkowy polimerów gwiazdzistych nie wpływa na żywotność komórek. Można zatem stwierdzić, że zaprojektowana struktura zsyntetyzowanych polimerów gwiazdzistych spełniła prognozowaną dla niej funkcję, zapewniając właściwość biokompatybilności wytworzonych materiałów polimerowych, w odróżnieniu od polimerów gwiazdzistych z zewnętrznymi, niechronionymi ramionami PDMAEMA wykorzystywanymi jako systemy do dostarczania kwasów nukleinowych [172, 175].

7.7 Kompleksacja polimerów gwiazdzistych i wydajność transfekcji

Polimery gwiazdziste zostały zaprojektowane w taki sposób, aby posiadały zdolność do wydajnego kompleksowania ujemnie naładowanych kwasów nukleinowych. Oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy gwiazdą polimerową a NA powinny być z jednej strony wystarczająco silne, aby umożliwiły kompleksację NA z gwiazdą, a z drugiej strony na tyle słabe by po wnikięciu do komórki możliwym było uwolnienie skompleksowanego NA. Zgodnie z badaniami H. Y. Cho i in. [176], kationowe polimery gwiazdziste cechuje dobra zdolność kompleksowania kwasów nukleinowych, a stąd

wysoka wydajność transfekcji, dzięki mniejszemu ładunkowi ujemnemu kompleksów, w porównaniu z NA. Odpowiednio duże wartości dodatniego ładunku molekuly polimeru kationowego może zapewnić dodatni ładunek takiego kompleksu, co umożliwia skuteczne dostarczanie NA do komórek.

Zdolność zsyntetyzowanych polimerów gwiazdzistych do tworzenia kompleksów i transfekcji genów (plazmidu DNA – pDNA) oceniono za pomocą reporterowego plazmidu lucyferazy (fluc, wektor pGL3-basic, Promega). Polipleksy wytworzono z użyciem reporterowego plazmidu, a następnie transfekowano je do komórek. Dla stężeń 0.06 i 0.012 mg/ml wodnych roztworów polipleksów (Rysunek 48) poziom aktywności lucyferazy był porównywalny do tego jaki otrzymano przy zastosowaniu FuGENE-HD jako środka do transfekcji. Maksymalny poziom aktywności lucyferazy, odzwierciedlający najlepszą wydajność, zaobserwowano dla stężenia 0.012 mg/ml. Należy zauważyć, że zarówno przy niższych, jak i wyższych od w/w stężeń procesy dostarczania pDNA są mniej skuteczne. Wyniki badań przedstawionych w pracy pozostają w zgodzie z tymi, które przeprowadzili Xiao i inni [177] oraz Champion i inni [178], którzy wykazali, że wydajność wprowadzania materiału genetycznego do komórek za pomocą kationowych nanocząstek jest wyższa niż w przypadku obojętnych lub ujemnie naładowanych polimerów. Również wielkość cząstek może odgrywać istotną rolę w internalizacji NA do komórek. Na podstawie doniesień literaturowych wiadomo, że nanomateriały o średnicy ponad 50 do 60 nm dostają się do komórek dzięki klatryno zależnej endocytozie, a cząstki o wielkości mniejszej niż 25 nm (do których zaliczają się wytworzone na potrzeby tej pracy polimery gwiazdziste) powinny ulegać endocytozie za pośrednictwem kaweoli, podczas której pH pozostaje neutralne [179]. Sugeruje to, że dostarczane przy użyciu polimerów gwiazdzistych kwasy nukleinowe powinny być stabilne i nie powinny ulegać degradacji lizosomalnej. Uzyskane wyniki wskazują na to, że polimery gwiazdziste na bazie PEG z kationowym rdzeniem mogą być z powodzeniem wykorzystane jako skuteczne niewirusowe nośniki do dostarczania NA, zwłaszcza przy stosunkowo niskich stężeniach.

8 WNIOSKI KOŃCOWE

Badania nad syntezą i opisem właściwości nowych, kationowych, biokompatybilnych i biodegradowalnych polimerów gwiazdzistych na bazie PEG jako modelowych układów do dostarczania leków i kwasów nukleinowych wykazały, że:

- 1) Polimery gwiazdziste zsyntetyzowane z zastosowaniem metody ATRP charakteryzują się wysoką masą cząsteczkową i niską polidispersyjnością.
- 2) Rozmiary molekuł badanych polimerów gwiazdzistych w roztworze wody deuteryzowanej wyznaczone na podstawie eksperymentu jądrowego rezonansu magnetycznego z wykorzystaniem zjawiska dyfuzji mają wartość rzędu 10 nm. Otrzymane wyniki bardzo dobrze korelują z danymi uzyskanymi z zastosowaniem metody dynamicznego rozpraszania światła. Wyniki uzyskane na podstawie badań NMR pozostają w zgodności z wynikami analizy badań mikroskopowych SEM i TEM.
- 3) W wyniku odparowania rozpuszczalnika zachodzą procesy agregacji gwiazd polimerowych. Istnienie tych procesów może mieć istotne znaczenie w preparatyce farmaceutycznej, której celem będzie wytworzenie wektorów polimerowych.
- 4) Zwiększanie udziału kationowego składnika w mieszaninie reakcyjnej prowadzi do zwiększania wartości potencjału zeta uzyskanych polimerów gwiazdzistych. Stwierdzono, że przy odpowiednim udziale tego składnika można uzyskać polimery o strukturze gwiazdy, charakteryzujące się dodatnią wartością tego potencjału. Trzy z czterech zsyntezowanych układów posiadają predyspozycje do wykorzystania ich w celu skompleksowania ujemnie naładowanego łańcucha kwasów nukleinowych.
- 5) Kationowe polimery z ramionami PEG wykazują brak toksyczności i charakteryzują się wysoką biokompatybilnością z organizmami żywymi, co wykazano za pomocą testu MTT.
- 6) Zsyntezowane polimery z rdzeniem zawierającym mostki dwusiarczkowe podlegają rozpadowi do rozmiarów zapewniających możliwość ich wydalenia z organizmu, co

stwierdzono na podstawie badań nad degradacją tych układów w warunkach imitujących środowisko wewnątrzkomórkowe.

- 7) Temperatury krystalizacji i topnienia oraz stopnia krystaliczności polimerów gwiaździstych na bazie poli(glikolu etylenowego) ulegają obniżeniu wraz ze wzrostem udziału kationowego składnika w rdzeniu gwiazdy. Wykazano, że istnieje możliwość regulacji tych parametrów poprzez dobór reagentów reakcji. Przeprowadzone badania potwierdzają, że układy te są stabilne w temperaturze pokojowej, co zapewnia możliwość zastosowania tych polimerów jako nośników leków i kwasów nukleinowych.

Literatura

1. **Wagner, E.** *Adv Polym Sci.* 247 (2012) 1–30
2. **Wang, J. S.; Matyjaszewski, K.** *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 5614–5615
3. **Galina, H.** *Fizykochemia polimerów.* Rzeszów: Oficyna Wydaw. Politech. Rzeszowskiej (1998)
4. **Rabek, J. F.** *Współczesna wiedza o polimerach.* Warszawa: PWN (2008)
5. **Braunecker, W. A.; Matyjaszewski, K.** *Prog. Polym. Sci.* 33 (1) (2008) 165
6. **Matyjaszewski, K.; Xia, J.** *Chem Rev.* 101 (9) (2001) 2921–2990
7. **Gao, H.; Matyjaszewski, K.** *Prog. Polym. Sci.* 34 (2009) 317–350
8. **Patten, T. E.; i in.** *Science (Washington, D. C.)* 272 (5263) (1996) 866–868
9. **Coessens, V.; Pintauer, T.; Matyjaszewski, K.** *Prog. Polym. Sci.* 26 (3) (2001) 337–377
10. **Matyjaszewski, K.; Davis, P. D.** *Handbook of radical polymerization.* New York : Wiley-Interscience (2002)
11. **Sieglwart, D. J.; i in.** *Macromol. Chem. Phys.* 209 (21) (2008) 2179–2193
12. **Averick, S. E.; i in.** *ACS Macro Lett.* 1 (1) (2012) 6–10
13. **Król, P.; Chmielarz, P.** *Polimery* 6 (2011) 427–508
14. **Bortel, E.** *Polimery.* 46 (2002) 593
15. **Braunecker, W. A.; Matyjaszewski, K.** *Prog. Polym. Sci.* 32 (2007) 93–146
16. **Blaese, R. M.; i in.** *Science* 270 (1995) 465–480
17. **Szala, S.** *Terapia genowa.* Warszawa: PWN (2003)
18. **Giacca, M.** *Gene Therapy.* Nowy Jork : Springer (2010)
19. **Averic, S. E.; i in.** *Biomacromolecules* 13 (2012) 3445–3449
20. **Maguire, A. M.; i in.** *The Lancet.* 374 (2009)
21. **Candotti, F.; i in.** *Blood.* 120 (2012) 3635–3646
22. **Nathwani, A. C., i in.** *New England Journal of Medicine* 365 (2011) 2357–2365
23. **Ma, J. B.; Ye, K.; Patel, D. J.** *Nature (London, U. K.)* 429 (6989) (2004) 318–322
24. **Akhtar, S.; Benter, I.** *Adv. Drug Delivery Rev.* 59 (2-3) (2007) 164–182
25. **Wonga, S. Y.; Peletb, J. M.; Putnama, D.** *Prog. Polym. Sci.* 32 (2007) 799–837
26. **El-Aneed, A. J.** *Controlled Release.* 94 (1) (2004) 1–14
27. <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>. *Gene Therapy Clinical Trials Worldwide.* [Online] John Wiley and Sons.
28. **Thomas, C. E.; Ehrhardt, A.; Kay, M. A.** *Nat. Rev. Genet.* 4 (5) (2003) 346–358

29. **Roth, J. A.; Cristiano, R. J.** *J. Natl. Cancer Inst.* 89 (1997) 21–39
30. **Fiedler, J. D.; i in.** *Angew. Chem. Int. Ed.* 49 (2010) 9648–9651
31. **Mitchell, R. S.; i in.** *PLoS Biology.* 2 (2004) 1127–1137
32. **Yang, L.; Xiao, X.** *Virology journal* 10 (2013) 50
33. **Manzenrieder, F.; Finn, M. G.** *Angew. Chem. Int. Ed.* 50 (2011) 2601–2605
34. **Brown, S. D.; Fiedler, J. D.; Finn, M. G.** *Biochemistry* 48 (2009) 11155–11157
35. **Duncan, R.; Ringsdorf, H.; Satchi-Fainaro, R.** *Adv. Polym. Sci.* 192 (2006) 1–8
36. **Lee, Y. i in.** *Bull Kor Chem Soc.* 29 (2008) 666–668
37. **Choi, J. H.; i in.** *Bull Kor Chem Soc.* 22 (2001) 46–52
38. **Duncan, R.; Izzo, L.** *Adv. Drug Delivery Rev.* 57 (15) (2005) 2215–2237
39. **Lee, Y.; Kataoka, K.** *Adv Polym Sci.* 249 (2012) 95–134
40. **Zhang, S.; i in.** *J. Control. Release.* 100 (2004) 165–180
41. **Nguyen, J.; Szoka, F. C.** *Acc Chem Res.* 45 (7) (2012) 1153–1162
42. **Cullis, P. R.; Chonn, A.; Semple, S. C** *Adv Drug Delivery Rev.* 32 (1998) 3–17
43. **Li, S.; i in.** *Gene Ther.* 6 (1999) 585–594
44. **Guimaraes, M. A. M.; Mourao, P. A. S.** *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1335 (1-2) (1997) 161–172
45. **Ringsdorf, H.; Schlarb, B.; Venzmer, J.** *Angew Chem Int Edit.* 27 (1998) 113–158
46. **Przygocki, W.** *Metody fizyczne badań polimerów.* Warszawa: PWN (1990)
47. **Blencowe, A.; i in.** *Polymer* 50 (2009) 5–32
48. **He, C.; Kim, S. W.; Lee, D. S.** *J. Controlled Release.* 127 (2008) 189–207
49. **Hoffman, A. S.** *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54 (2002) 3–12
50. **Chang, Y.; i in.** *Macromolecules* 38 (2005) 6201–6209
51. **Alarcon, C.; Pennadam, S.; Alexander, C.** *Chem. Soc. Rev.* 34 (2005) 276–285
52. **Gao, H.; Matyjaszewski, K.** *Macromolecules* 41 (2008) 4250–4257
53. http://www.cmu.edu/maty/materials/Polymers_with_Specific_Architecture/star-copolymers.html#stars. [Online]
54. **Gao, H.; Ohno, S.; Matyjaszewski, K.** *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 15111–15113
55. **Tsarevsky, N. V.; Huang, J.; Matyjaszewski, K.** *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* 47 (24) (2009) 6839–6851
56. **York, A. W.; i in.** *Biomacromolecules* 10 (2009) 936–43
57. **Xu, F. J.; Yang, W. T.** *P Prog. Polym. Sci.* 36 (2011) 1099–1131
58. **Makrocka - Rydzyk, M.; i in.** *Polymer* 52 (2011) 5513–5520

59. Makrocka-Rydzik, M.; **i in.** *Z. Phys. Chem.* 226 (11-12) (2012) 1271
60. Geng, Y.; **i in.** *J Polym Sci (B) Polym Phys.* 48 (2010) 106–112
61. Park, S.; **i in.** *Macromolecules* 46 (15) (2013) 5856–5860
62. Yamaguchi, N.; Kiick, K. *Biomacromolecules* 6 (4) (2005) 1921–1930
63. Liu, T.; Zhang, Y.; Liu, S. *Chin. J. Polym. Sci.* 31 (6) (2013) 924–937
64. Tjelle, T. E.; **i in.** *Methods Mol Biol.* 423 (2008) 497–507
65. Hagstrom, J. E.; **i in.** *Mol Ther.* 10 (2004) 386–398
66. Lysik, M. A.; Wu-Pong, S. *J Pharm Sci.* 92 (2003) 1559–1573
67. Bergen, M.; Chen, R.; Gonzalez, R. *Expert Opin Biol Ther.* 3 (2003) 377–384
68. Plank, C.; **i in.** *Hum Gene Ther.* 7 (1996) 1437–1446
69. Merdan, T.; **i in.** *Bioconjug Chem.* 16 (2005) 785–792
70. Burke, R. S.; Pun, S. H. *Bioconjug Chem.* 19 (2008) 693–704
71. Averick, S. E.; **i in.** *J Am Chem Soc.* 135 (14) (2013) 12508–12511
72. Fisher, P. M. *Med. Res Rev.* 27 (6) (2007) 755–95
73. Guo, J.; **i in.** *Carbohydr Polym.* 79 (2010) 277–83
74. Oh, J. K.; **i in.** *Prog. Polym. Sci.* 33 (4) (2008) 448–477
75. Norman, A. I.; **i in.** *Macromolecules* 40 (2007) 2559–2567
76. Lapienis, G. *Prog. Polym. Sci.* 34 (2009) 852–892
77. Kloxin, A. M.; Kasko, A. M. *Science* 324 (5923) (2009) 59–63
78. Gonzalez-Simon, A. L.; Eniola-Adefeso, O. Host Response to Biomaterials. - S. K. Bhatia. *Engineering Biomaterials for Regenerative Medicine: Novel Technologies for Clinical Applications.*, London: Springer (2012)
79. Coulembier, O.; **i in.** *Prog Polym Sci.* 31 (2006) 723
80. Pospiech, D.; **i in.** *Biomacromolecules* 6 (2005) 439
81. Lee, S.; **i in.** *Bioconjug Chem.* 18 (2007) 4
82. Duncan, R. *Nat Rev Drug Discov.* 2 (2003) 347–36
83. Zauner, W.; **i in.** *Biotechniques* 20 (1996) 905–913
84. Wagner, E.; Ogris, M.; Zauner, W. *Adv Drug Deliv Rev.* 30 (1998) 97–113
85. Zou, S. M.; **i in.** *J Gene Med.* 2 (2000) 128–134
86. van de Wetering, P.; **i in.** *J Control Release.* 53 (1998) 145–153
87. Boussif, O.; **i in.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 92 (1995) 7297–7301
88. Fant, K.; **i in.** *Biochemistry* 47 (2008) 1732–1740
89. Zhou, J.; **i in.** *Chem Commun (Camb).*(2006) 2362–2364
90. Prevette, L. E.; **i in.** *Langmuir* 23 (2007) 9773–9784

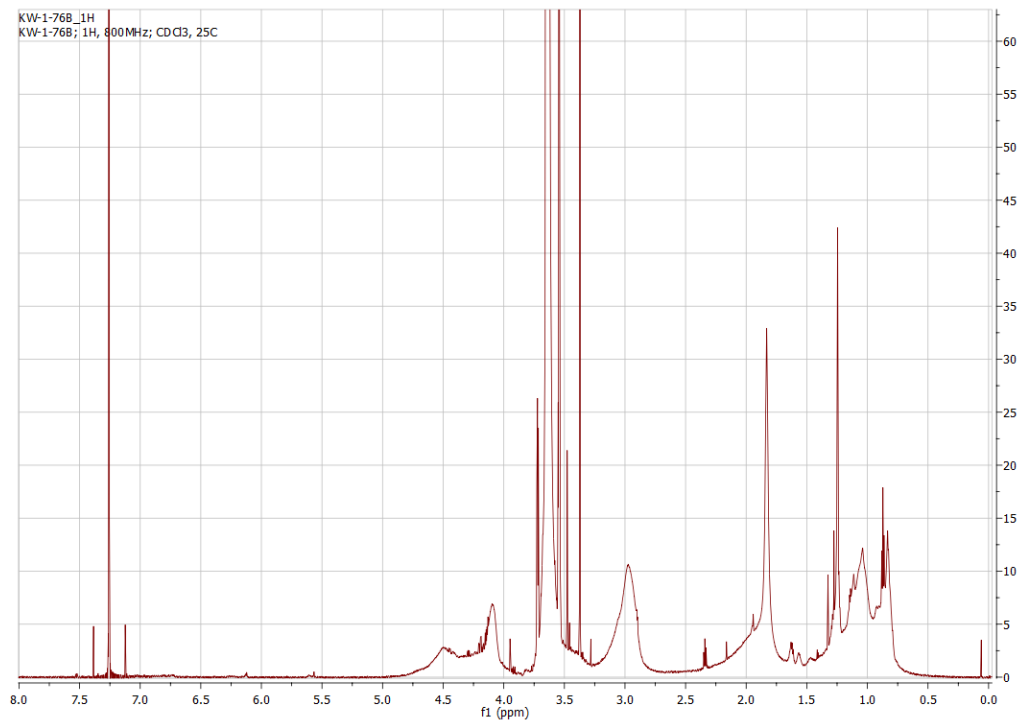
91. **Philipp, A.; i in.** *Bioconjug Chem.* 20 (2009) 2055–2061
92. **Tamura, A.; Oishi, M.; Nagasaki, Y.** *Biomacromolecules* 10 (2009) 1818–1827
93. **Meyer, M.; i in.** *Mol Pharmaceutics* 6 (2009) 752–762
94. **Bloch, F.** *Physical Review.* 70 (1946) 460–474
95. **Bloch, F.; Hansen, W. W.; Packard, M.** *Phys. Rev.* 70 (1946) 474
96. **Ernst, R. R.; Anderson, W. A.** *Rev. Sci. Instrum.* 37 (1966) 93
97. **Aue, W. P.; Bartholdi, E.; Ernst, R. R.** *J. Chem. Phys.* 64 (5) (1976) 2229–2246
98. **Slichter, C. P.** *Principles of Magnetic Resonance.* Berlin: Springer-Verlag (1990)
99. **Hennel, J. W.; Klinowski, J.** *Podstawy magnetycznego rezonansu jądrowego.* Poznań: W.N. UAM (2000)
100. **Vega, S.; Pines, A.** *J. Chem. Phys.* 66 (1977) 5624
101. **Ding, K.; Gronenborn, A.M.** *J. Magn. Reson.* 156 (2) (2002) 262–268
102. **Wider, G.; Wüthrich, K.** *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9 (5) (1999) 594–601
103. **Knight, W. D.** *Phys. Rev.* 76 (1949) 1259
104. **Morris, K. F.; Johnson, C. S. Jr.** *J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992) 3139–3141
105. **Stejskal, E. O.** *J. Chem. Phys.* 43 (10) (1965) 3597
106. **Cohen, Y.; Avram, L.; Frish, L.** *Angew. Chem. Int. Ed.* 44 (2005) 520–554
107. **Hrabe, J.; Kaur, G.; Guilfoyle, D. N.** *J. Med. Phys.* 32 (1) (2007) 34–42
108. **Lukas, K.; LeMaire, P. K.** *Resonance* (2009)
109. **Przygocki, W.; Włochowicz, A.** *Fizyka polimerów* Warszawa: PWN (2001)
110. **Bhadeshia, H. K. D. H.** *Differential scanning calorimetry*
111. **Rabek, J. F.** *Podstawy fizykochemii polimerów* Wrocław: Politechnika Wrocławska (1977)
112. **Sawyer, L. C.; Grub, D. T.; Meyers, G. F.** *Polymer Microscopy* Springer (2008)
113. **Knoll, M.** *Z tech. Phys.* 16 (1935) 467–475
114. **Kędziński, Z.; Stępiński, J.** *Elektronowy mikroskop skaningowy (SEM)* UWN AGH.
115. <http://www.bookrags.com/biography/ernst-august-friedrich-ruska/>. [Online]
116. **Strobl, G.** *The Physics of Polymers.* Nowy Jork: Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2007)
117. **Pecora, R.** *Dynamic Light Scattering: Applications of Photon Correlation Spectroscopy* Springer Science & Business Media (1985)
118. **Berne, B. J.; Pecora, R.** *Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics* Courier Dover Publications (2000)

119. **Ostrowski, W.** *Postepy biochemii* 15(2) (1969) 295
120. **Chiba, K.; Kawakami, K.; Tohyama, K.** *Toxicol. in Vitro.* 12 (3) (1998) 251–258
121. **Fotakis, G.; Timbrell, J.A.** *Toxicol. Lett.* 160 (2) (2006) 171–177
122. **Krzysztoń-Russjan, J.; Książek, I.; Anuszevska, E.** *Farm Pol.* 65 (6) (2009) 395–402
123. **Mossman, T. J.** *J. Immunol. Meth.* 65 (1983) 55–63
124. **Niu, Q. X.** *J. Immunol. Meth.* 251 (2001) 11–19
125. **Navath, R. S.** *J. Controlled Release* 142 (2010) 447–456
126. **Hu, XX.; i in.** *J. Mater. Chem. B.* 1 (2013) 1109–1118
127. **Graham, F. L.; van der Eb, A. J.** *Virology* 52 (2) (1973) 456–467
128. **Gao, H.; Tsarevsky, N. V.; Matyjaszewski, K.** *Macromolecules* 38 (14) (2005) 5995–6004
129. **Tsarevsky, N. V.; Matyjaszewski, K.** *Macromolecules* 38 (8) (2005) 3087–3092
130. **Ruby, J. G.; Jan, C. H.; Bartel, D. P.** *Nature* 448 (2007) 7149
131. **Gao, H.; Matyjaszewski, K.** *Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 11828–11834
132. **Godbey, W. T.; Wu, K. K.; Mikos, A. G.** *J. Control. Release.* 60 (1999) 149–160
133. **Bhatia, S. K.** *Engineering Biomaterials for Regenerative Medicine, Novel Technologies for Clinical Applications* Springer (2012)
134. **Nyanhongo, G. S.** *Biofunctionalization of Polymers and their Applications* Springer (2011)
135. **Shin, S. J.; Beech, J. R.; Kelly, K. A.** *Integr. Biol.* 5 (2013) 29–42
136. **Coll, H.; Gilding, D. K.** *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* 8 (1) (1970) 89–103
137. **Boyer, C.; i in.** *Polymer* 45 (2004) 7863–7876
138. **Bromberg, L.; i in.** *Bioconjugate Chem.* 16 (2005) 623–633
139. **Takahashi, Y.; Tadokoro, H.** *Macromolecules* 6 (5) (1973) 672–675
140. **Wise, D. L.** *Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology* CRC Press (2000)
141. **Hegde, R. R.; Kamath, M. G.; Dahiya, A.** *Polymer Crystallinity.* www.utk.edu.
142. **Wang, L.; Dong, C. M.** *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* 44 (2006) 2226–2236
143. **Mya, K. Y.; Pramoda, K. P.; He, C. B.** *Polymer* 47 (2006) 5035–5043
144. **Lapienis, G.** *Polymer* 50 (1) (2009) 77–84

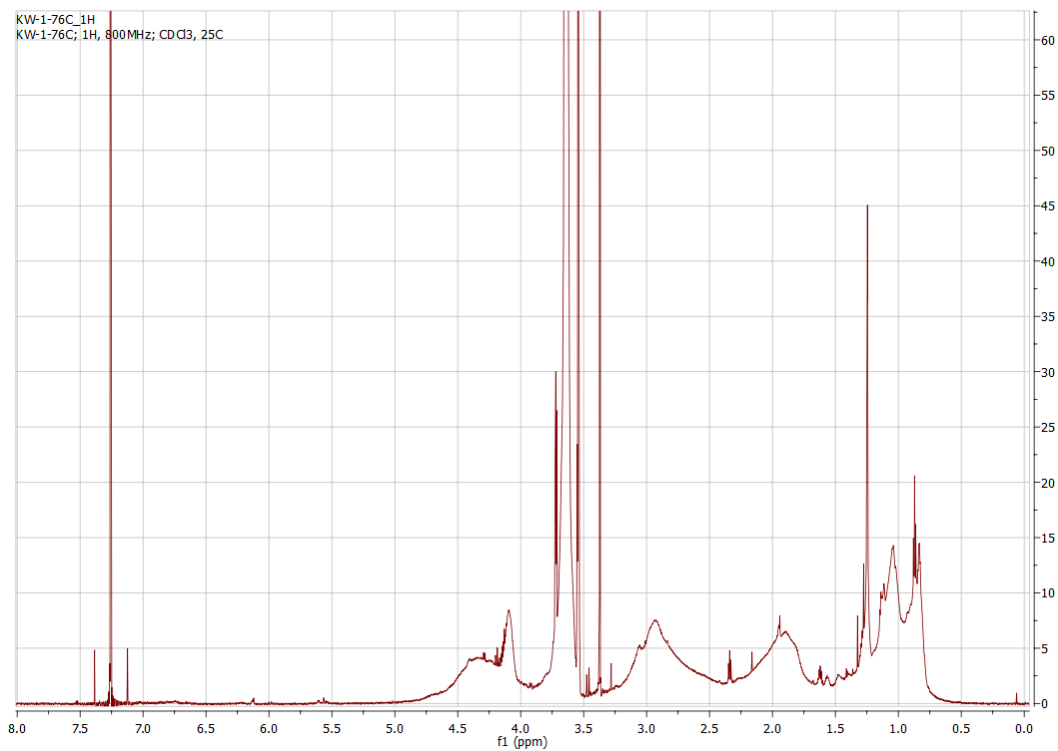
145. **Pagacz, J.; Pielichowski, K.** *Technical Transactions Chemistry* 109 (16) (2012) 129–145
146. **Schick, C.** *Anal Bioanal Chem.* 395 (6) (2009) 1589–1611
147. **Kong, Y.; Hay, J. N.** *Polymer* 43 (2002) 3873–3878
148. **Cheng, S. Z. D.; Chen, J.; Janimak, J. J.** *Polymer* 31 (6) (1990) 1018–1024
149. **Spitael, P.; Macosko, C. W.; McClurg, R. B.** *Macromolecules* 37 (2004) 6874–6882
150. **Jeeju, P. P.; i in.** *Mater. Chem. Phys.* 134 (2-3) (2012) 803–808
151. **Shull, K. R.; Kramer, E. J.; Fetters, L. J.** *Nature* 345 (1990) 790–791
152. **de Gennes, P. G.** *J. Phys.* 36 (1975) 1199–1207
153. **Flory, P. J.** *Principles of polymer chemistry.* Ithaca: Cornell University Press (1953)
154. **Graessley, W. W.** *Adv. Polym. Sci.* 47 (1982) 67–117
155. **Rubinstein, M.** *Phys. Rev. Lett.* 1986, Vol. 24, p. 3023–3026
156. **Klein, J.** *Macromolecules* 19 (1986) 105–118
157. **Ngai, K. L.; Roland, C. M.** *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* 35 (1997) 2503–2510
158. **Vlassopoulos, D.; i in.** *J. Phys.: Condens. Matter.* 13 (2001) R855–R876
159. **Lapham, J.; i in.** *J. Biomol. NMR* 10 (1997) 255–262
160. **van de Wetering, P.; i in.** *Bioconjugate Chem.* 10 (4) (1999) 589–597
161. **Zolnik, B. S.; Burgess, D. J.** *J. Controlled Release* 122 (3) (2007) 338–344
162. **Kakizawa, Y.; Kataoka, K.** *Adv. Drug Delivery Rev.* 54 (2) (2002) 203–222
163. **Oh, J. K.; i in.** *J. Am. Chem. Soc.* 129 (18) (2007) 5939–5945
164. **Oh, J. K.; Siegwart, D. J.; Matyjaszewski, K.** *Biomacromolecules* 8 (11) (2007) 3326–3331
165. **Rikkou, M. D.; Patrickios, C. S.** *Prog. Polym. Sci.* 36 (8) (2011) 1079–1097
166. **Liu, J.; i in.** *Chem. Commun.* 48 (2008) 6582–6584
167. **Jones, D. P.; i in.** *Free Radic Biol Med.* 28 (2000) 625–635
168. **Lee, Y.; i in.** *Bioconjug Chem.* 18 (2007) 13–18
169. **Monahan, F. J.; German, J. B.; Kinsella, J. E.** *J. Agric. Food Chem.* 43 (1) (1995) 46–52
170. **Jones, R. A.; Poniris, M. H.; Wilson, M. R.** *J. Controlled Release* 96 (3) (2004) 379–391
171. **van de Wetering, P.; i in.** *J. Controlled Release* 49 (1) (1997) 59–69

172. **Alhoranta, A. M.; i in.** *Biomacromolecules* 12 (9) (2011) 3213–3222
173. **Petersen, H.; i in.** *Bioconjugate Chem.* 13 (4) (2002) 845–854
174. **Zhang, Y.; i in.** *Biomacromolecules* 13 (2) (2011) 313–322
175. **Dai, F.; i in.** *Biomaterials* 31 (3) (2010) 559–569
176. **Cho, H. Y.; i in.** *Biomacromolecules.* 14 (2013) 1262–1267
177. **Xiao, K.; i in.** *Biomaterials* 32 (13) (2011) 3435–3446
178. **Champion, J. A.; Mitragotri, S.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (13) (2006) 4930–4934
179. **Conner, S. D.; Schmid, S. L.** *Nature* 422 (6927) (2003) 37–44

Dodatek A.



Rysunek 50 Widmo ^1H NMR próbki KW-1-76B w chloroformie



Rysunek 51 Widmo ^1H NMR próbki KW-1-76C w chloroformie

Spis ilustracji

RYSUNEK 1 Równowaga pomiędzy aktywnym i uśpionym stanem w mechanizmie ATRP. R-X: halogenek alkilu; M^{n+} : jon metalu przejściowego; L_x : ligand [14].....	18
RYSUNEK 2 Schematyczne przedstawienie idealnego wektora polimerowego [45]	26
RYSUNEK 3 Schematyczne przedstawienie regionów krystalicznych i amorficznych w polimerze semikrystalicznym.....	27
RYSUNEK 4 Różne podtypy rozgałęzionych polimerów A) gwiaździste, B) szczotki i C) statystycznie rozgałęzione (dendrytyczne).....	29
RYSUNEK 5 Podstawowe sposoby syntezy polimerów gwiaździstych [53].....	30
RYSUNEK 6 Przykładowe widmo DOSY	38
RYSUNEK 7 Sekwencja DOSY z echem stymulowanym	39
RYSUNEK 8 Schemat komory pomiarowej kalorymetru dsc wykorzystującego metodę kompensacji mocy, S – próbka badana, R – próbka odniesienia [110].....	41
RYSUNEK 9 Zmiany różnicy temperatur $\Delta T = FT$ dla reakcji egzotermicznych i endotermicznych [111].....	42
RYSUNEK 10 Proces dewitryfikacji, zachodzący w trakcie grzania próbki, z wyraźnie uwidocznionym przejściem szklistym [111].....	43
RYSUNEK 11. Schemat budowy kolumny elektronowej; (1) działo elektronowe, (2) soczewka elektronowa (kondensora), (3) spray aperture, (4) cewki skanujące, (5) apertura końcowej soczewki, (6) próbka, (7) pompa próżniowa, (8) detektor, (9) wzmacniacz, (10) obraz na ekranie, kineskop (11) generator skanowania, (12) kontrola powiększenia obrazu.....	45
RYSUNEK 12 Efekty oddziaływania elektronów z ciałem stałym	46
RYSUNEK 13 Budowa TEM.....	47
RYSUNEK 14 Zasada działania mikroskopu polaryzacyjnego: transmisja światła przez preparat (izotropowy i anizotropowy) umieszczony między skrzyżowanymi polaryzatorem i analizatorem	49
RYSUNEK 15 Schemat ilustrujący powstawanie obrazu krzyża maltańskiego w wyniku przejścia światła spolaryzowanego przez sferolit	50
RYSUNEK 16 Schematyczne przedstawienie płaszczyzn występujących w roztworze, istotnych w pomiarach potencjału Zeta.....	52
RYSUNEK 17 Spektrometr NMR Agilent 800 MHz.....	60
RYSUNEK 18 Spektrometr NMR Agilent 400 MHz.....	60
RYSUNEK 19 Uproszczony schemat sekwencji dpfgdste do pomiarów współczynnika dyfuzji	61

RYSUNEK 20 Tłumienie dyfuzyjne intensywności linii rezonansowej gwiazdy polimerowej KW-1-76B w roztworze wodnym	62
RYSUNEK 21 Tłumienie dyfuzyjne dla próbki KW-1-76B o stężeniu 4 mg/ml	63
RYSUNEK 22 Skaningowy kalorymetr różnicowy z kompensacją mocy DSC (Perkin Elmer).....	63
RYSUNEK 23 Skaningowy mikroskop elektronowy (JEOL).....	64
RYSUNEK 24 Mikroskop polaryzacyjny (Leica)	65
RYSUNEK 25 Hodowla komórkowa sms-ctn: poddana stymulacji badanymi związkami (A); po dodaniu MTT (B), schematyczne przedstawienie wysianych komórek na płytce (C).....	67
RYSUNEK 26 Komórki SMS-CTN (A); komórki SMS-CTN, w których wytworzyły się kryształy formazanu na skutek aktywności MTT (B)	67
RYSUNEK 27 Widmo ^1H NMR crosslinkera DSDMA	70
RYSUNEK 28 Krzywe chromatograficzne dla badanych próbek polimerów gwiazdzistych	73
RYSUNEK 29 Schematyczny wzór strukturalny gwiazdy polimerowej.....	75
RYSUNEK 30 Widmo ^1H NMR próbki KW-1-76A w chloroformie.....	76
RYSUNEK 31 Widmo ^1H NMR próbki KW-1-76D w chloroformie.....	76
RYSUNEK 32 Widmo DOSY dla roztworu o stężeniu 4 mg/ml w D_2O próbki KW-1-76B	77
RYSUNEK 33 Rozkład średnic molekuł polimeru gwiazdzistego KW-1-76B W roztworze wodnym ...	78
RYSUNEK 34 Zdjęcie uzyskane dla molekuł polimeru KW-1-76B w roztworze wodnym z użyciem DLS Nanosight.....	79
RYSUNEK 35 Badania degradacji próbek KW-1-76A i KW-1-76B za pomocą DLS	80
RYSUNEK 36 Badania degradacji próbek KW-1-76C i KW-1-76D za pomocą DLS.....	81
RYSUNEK 37 Termogramy zarejestrowane dla polimerów gwiazdzistych w trybie grzania i chłodzenia, dla próbek KW-1-76A oraz KW-1-76B.....	83
RYSUNEK 38 Termogramy zarejestrowane dla polimerów gwiazdzistych w trybie grzania i chłodzenia, dla próbek KW-1-76C oraz KW-1-76D.....	84
RYSUNEK 39 Zdjęcia wykonane z zastosowaniem POM obrazujące wzrost sferolitów, zachodzący w wyniku krystalizacji PEO	86
RYSUNEK 40 Zdjęcie SEM próbki KW-1-76C; powiększenie – 2,500 X (roztwór wodny)	87
RYSUNEK 41 Zdjęcie SEM próbki KW-1-76C; powiększenie – 8,500 X (roztwór wodny)	87
RYSUNEK 42 Zdjęcia SEM próbki KW-1-76C; powiększenie – 430,000 X (roztwór w metanolu)	88
RYSUNEK 43 Zdjęcia SEM próbki KW-1-76C; powiększenie – 550,000 X (roztwór w metanolu)	88

RYSUNEK 44 Obraz TEM próbki KW-1-76C (A), pojedynczego kłębka polimeru gwiaździstego (B) oraz schematyczne przedstawienie splątania gwiazd polimerowych (C)	89
RYSUNEK 45 Zdjęcie uzyskane z użyciem mikroskopu TEM dla roztworu polimeru gwiaździstego KW-1-76C o stężeniu 10 mg/ml, przy rosnącym powiększeniu (A) – (C).....	91
RYSUNEK 46 Zdjęcie uzyskane z użyciem mikroskopu TEM dla roztworu polimeru gwiaździstego KW-1-76C o stężeniu 0.2 mg/ml, przy rosnącym powiększeniu (A) – (C).....	92
RYSUNEK 47 Zależność przeżywalności komórek od stężenia badanych polimerów określana w teście MTT	93
RYSUNEK 48 Wydajność transfekcji gwiazdy polimerowej KW-1-76C, tylko plazmid DNA (neg ctr, bez czynnika transfekującego), 20 ng plazmidu z FUGENE-HD (pos ctr), różne stosunki gwiazda/pDNA (76), oraz różne stosunki PEI/PDNA (PEI)	95
RYSUNEK 49 Etapy, które powinien przejść wydajny wektor polimerowy (opis w tekście).....	96
RYSUNEK 50 Widmo ¹ H NMR próbki KW-1-76B w chloroformie.....	117
RYSUNEK 51 Widmo ¹ H NMR próbki KW-1-76C w chloroformie.....	117

OŚWIADCZENIE

Poznań, dnia

Ja, niżej podpisana, **Katarzyna Barbara Szcześniak**, doktorantka Wydziału Fizyki Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu oświadczam, że przedkładaną rozprawę doktorską pt: **”Polimery gwiaździste jako modelowe nanotransportery leków i kwasów nukleinowych: synteza, struktura i dynamika kationowych polimerów gwiaździstych na bazie poli(glikolu etylenowego)”**, napisałam samodzielnie. Oznacza to, że przy pisaniu, poza niezbędnymi konsultacjami, nie korzystałam z pomocy innych osób, a w szczególności nie zlecałam opracowania rozprawy lub jej części innym osobom, ani nie odpisywałam tej rozprawy lub jej części od innych osób.

Jednocześnie przyjmuję do wiadomości, że gdyby powyższe oświadczenie okazało się nieprawdziwe, decyzja o wydaniu mi dyplomu zostanie cofnięta.

Katarzyna Szcześniak