



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Nika Gazdek Serdar

**CIKLODEKSTRINI I SAMOUDRUŽENI OLIGOPEPTIDI
KAO SUPRAMOLEKULSKI SUSTAVI ZA VEZANJE I
CILJANO OTPUŠTANJE BIOMOLEKULA**

DOKTORSKI RAD

Mentor: dr. sc. Leo Frkanec

Zagreb, 2025.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Nika Gazdek Serdar

**CYCLODEXTRINS AND OLIGOPEPTIDE
SELF-ASSEMBLIES AS SUPRAMOLECULAR
SYSTEMS FOR BINDING AND CONTROLLED
RELEASE OF BIOMOLECULES**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor: dr. sc. Leo Frkanec

Zagreb, 2025.

Ova disertacija izrađena je u Laboratoriju za biomolekularne interakcije i spektroskopiju u Grupi za supramolekulsku kemiju, na Zavodu za organsku kemiju i biokemiju, na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu, pod vodstvom dr. sc. Lea Frkanca, u sklopu doktorskog studija Kemija smjer Organska kemija, Sveučilišta u Zagrebu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta.



Doktorsku disertaciju financirala je Hrvatska zaklada za znanost u sklopu projekta: „Sinteza supramolekulskih samo-udruženih nanostruktura za izgradnju naprednih funkcionalnih materijala „IP-2018-01-6910“



Zahvaljujem se mentoru dr. sc. Leu Frkancu na pruženoj prilici za izradu doktorske disertacije te na prenesenom znanju, iskustvu i svim savjetima tijekom izrade doktorske disertacije.

Zahvaljujem akademiku Ivi Piantanidi na ukazanom povjerenju na ispitivanju metoda ekstrakcije toksina ciklodekstrinima te pomoći i savjetima kod pisanja disertacije.

Zahvaljujem svima u Laboratorija za biomolekulske interakcije i spektroskopiju na savjetima i ugodnom društvu.

Zahvaljujem i tehničarkama na čistim otapalima, traženju kemikalija i svemu što je pomoglo da se eksperimentalni dio provede brzo i točno.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Ruži Frkanec na pomoći oko biološkog ispitivanja spojeva na miševima.

Zahvaljujem dipl. ing. Luciji Horvat i dr. sc. Hrvoju Fulgosiju s Instituta Ruđer Bošković na snimanju mnogobrojnih TEM mikrografija.

Svim članovima Centra za NMR zahvaljujem na snimanju spektara.

Zahvaljujem svim prijateljima i kolegama koji su mi na bilo koji način pomogli i bili mi potpora, a posebno zahvaljujem roditeljima na ljubavi i podršci.

Najveće hvala mom suprugu Tinu što mi je bio najveća potpora i oslonac i na nesebičnoj ljubavi i podršci cijelim putem.

Sadržaj

SAŽETAK.....	XV
ABSTRACT	XVII
§ 1. UVOD.....	19
§ 2. LITERATURNI PREGLED	23
2.1. Supramolekulska kemija.....	23
2.2. Molekulsko samoudruživanje	24
2.2.1. Supramolekulski hidrogelovi.....	26
2.3. Molekulsko samoudruživanje peptida i peptidni gelovi	32
2.4. Bioinspirirani kratki peptidi za istraživanje amiloidne agregacije	36
2.4.1. Uloga dipeptida Phe-Phe u samoudruživanju kratkih peptida	40
2.4.2. Konfiguracije aminokiselina u gelovima	43
2.4.3. Sustavi s peptidnim hidrogelovima za dostavu lijekova	44
2.5. Domaćin-gost sustavi.....	46
2.6. Ciklodekstrini	46
2.7. Inkluzijski kompleksi ciklodekstrina s malim molekulama i biomolekulama	51
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	55
3.1. Uvod	55
3.2. Sintaza tripeptidnih derivata	58
3.2.1. Priprava derivata s aminokiselinskom sekvencom L-Phe-L-Phe-L-Ala	58
3.2.1.1. (tert-butoksikarbonil)-L-fenilalanin; Boc-L-Phe-OH (1).....	58
3.2.1.2. L-alanin metilester hidroklorid; L-Ala-OMe x HCl (2).....	58
3.2.1.3. Metil(tert-butoksikarbonil)-L-fenilalanil-L-alaninat; Boc-L-Phe-L-Ala-OMe (3).....	59
3.2.1.4. N-(trifluoroacetil)-L-fenilalanin-L-alaninat; NH ₃ ⁺ TFA ⁻ -L-Phe-L-Ala-OMe (4).....	59
3.2.1.5. N-acetil-L-fenilalanin; Ac-L-PheOH (5)	60
3.2.1.6. N-acetil-L-fenilalanin-L-fenilalanin-L-alaninat; Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-OMe (6)	60

3.2.1.7. <i>N</i> -acetil- <i>L</i> -fenilalanin- <i>L</i> -fenilalanin- <i>L</i> -alanin amid; Ac- <i>L</i> -Phe- <i>L</i> -Phe- <i>L</i> -Ala-NH ₂ (7).....	61
3.2.1.8. <i>N</i> -acetil- <i>L</i> -fenilalanin- <i>L</i> -fenilalanin- <i>L</i> -alanin; Ac- <i>L</i> -Phe- <i>L</i> -Phe- <i>L</i> -Ala-OH (8).....	62
3.2.1.9. (((9 <i>H</i> -fluoren-9-il)metoksi)karbonil)- <i>L</i> -fenilalanil- <i>L</i> -fenilalanil- <i>L</i> -alaninat; Fmoc- <i>L</i> -Phe- <i>L</i> -Phe- <i>L</i> -Ala-OMe (9).....	63
3.2.2. Priprava derivata s aminokiselinskom sekvencom <i>L</i> -Phe- <i>D</i> -Phe- <i>L</i> -Ala.....	64
3.2.2.1. Metil(tert-butoksikarbonil)- <i>D</i> -fenilalanil- <i>L</i> -alaninat; Boc- <i>D</i> -Phe- <i>L</i> -Ala-OMe (10).....	64
3.2.2.2. <i>N</i> -(trifluoroacetil)- <i>D</i> -fenilalanin- <i>L</i> -alaninat; NH ₃ ⁺ TFA ⁻ - <i>D</i> -Phe- <i>L</i> -Ala-OMe (11).....	64
3.2.2.3. <i>N</i> -acetil- <i>L</i> -fenilalanin- <i>D</i> -fenilalanin- <i>L</i> -alaninat; Ac- <i>L</i> -Phe- <i>D</i> -Phe- <i>L</i> -Ala-OMe (12).....	65
3.2.2.4. <i>N</i> -acetil- <i>L</i> -fenilalanin- <i>D</i> -fenilalanin- <i>L</i> -alanin amid; Ac- <i>L</i> -Phe- <i>D</i> -Phe- <i>L</i> -Ala-NH ₂ (13).....	66
3.2.2.5. (((9 <i>H</i> -fluoren-9-il)metoksi)karbonil)- <i>L</i> -fenilalanil- <i>D</i> -fenilalanil- <i>L</i> -alaninat; Fmoc- <i>L</i> -Phe- <i>D</i> -Phe- <i>L</i> -Ala-OMe (14).....	67
3.3. Geliranje tripeptidnih derivata.....	68
3.4. Priprema kompozitnog hidrogela Ac-<i>L</i>-Phe-<i>L</i>-Phe-<i>L</i>-Ala-NH₂ s liposomima i proteinom ..	68
3.4.1. Priprema pufera.....	68
3.4.2. Priprema liposoma.....	68
3.4.3. Dinamičko raspršenje svjetlosti (DLS) liposoma.....	69
3.4.4. Priprema kompozita hidrogela Ac- <i>L</i> -Phe- <i>L</i> -Phe- <i>L</i> -Ala-NH ₂ s liposomima i proteinima.....	69
3.4.5. Diferencijacijska skenirajuća kalorimetrija (DSC)	69
3.4.6. FTIR-ATR.....	70
3.5. Priprema hidrogela Ac-<i>L</i>-Phe-<i>L</i>-Phe-<i>L</i>-Ala-NH₂ s doksorubicinom i nanoformulacijama doksorubicina	70
3.5.1. Hidrogel s doksorubicinom.....	70
3.5.2. Hidrogel s liposomskom formulacijom DOX	71
3.5.3. Hidrogel s PLGA-Dox.....	71
3.6. Morfološka karakterizacija kompozitnih hidrogelova transmisijom elektronskom mikroskopijom i mikroskopom atomskih sila	71
3.7. In vivo ispitivanje imunostimulacijske aktivnosti peptidnih hidrogelova	72
3.7.1. Pokusne životinje i imunizacija.....	72

3.7.2. ELISA za kvantitativno određivanje anti-OVA IgG	72
3.7.3. Statistička obrada podataka.....	73
3.8. Otpuštanje doksorubicina i biomolekula iz hidrogela Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH₂	73
3.8.1. Određivanje baždarnih dijagrama.....	73
3.8.2. Mjerenje otpuštanja UV-Vis optičkom sondom.....	74
3.8.3. Mjerenje otpuštanja UV-Vis u kiveti.....	74
3.9. Kompleksi ciklodekstrina s aristolohijskom kiselinom i biomolekulama.....	75
3.9.1. Karakterizacija derivata aristolohijske kiseline u biorelevantnom mediju.....	75
3.9.2. Interakcija aristolohijske kiseline s ciklodekstrinima i goveđim serumom albumina (BSA) i DNA iz telećeg timusa (ct-DNA)	75
3.9.3. Mjerenja interakcija izotermalnom kalorimetrijskom titracijom (ITC).....	76
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	77
4.1. Priprava tripeptidnih derivata.....	77
4.1.1. Priprava derivata s aminokiselinskom sekvencom L-Phe-L-Phe-L-Ala	77
4.1.2. Priprava derivata s aminokiselinskom sekvencom L-Phe-D-Phe-L-Ala.....	78
4.2. Geliranje tripeptidnih derivata.....	79
4.2.1. Geliranje Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH ₂ u ovisnosti o pH.....	83
4.2.2. Geliranje Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH ₂ gela s liposomima i proteinom.....	84
4.2.3. Geliranje hidrogela Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH ₂ s doksorubicinom i nanoformulacijama doksorubicina.....	86
4.3. Morfološka karakterizacija derivata tripeptida TEM mikroskopijom	88
4.4. Ispitivanje utjecaja liposoma i proteina FITC-BSA na gelirajuća svojstva hidrogelatora .	94
4.4.1. Morfološka karakterizacija hidrogela s liposomima i proteinima.....	94
4.4.2. Dinamičko raspršenje svjetla (DLS)	98
4.4.3. Ispitivanje interakcije hidrogela i liposoma metodom DSC	99
4.4.4. FTIR -ATR karakterizacija interakcije hidrogela i liposoma	102
4.5. Karakterizacija kompozitnih formulacija hidrogela Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH₂ s nanoformulacijama doksorubicina.....	105

4.5.1. TEM karakterizacija kompozita hidrogela.....	105
4.6. In vivo testiranje imunostimulirajuće aktivnosti peptidnih hidrogelatora	105
4.7. Otpuštanje biomolekula i malih molekula iz hidrogela Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH₂	110
4.7.1. Baždarni dijagram i otpuštanje Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH ₂	110
4.7.2. Baždarni dijagram i otpuštanje BSA.....	112
4.7.3. Baždarni dijagram i otpuštanje DOX iz hidrogela	116
4.7.4. Baždarni dijagram i otpuštanje DOX iz liposomske formulacije ugrađene u hidrogel	117
4.7.5. Baždarni dijagram i otpuštanje DOX iz PLGA-Dox ugrađen u hidrogel	119
4.8. Kompleksi ciklodekstrina s aristolohijskom kiselinom i malim biomolekulama	121
4.8.1. Karakterizacija derivata aristolohijske kiseline u biorelevantnom mediju.....	121
4.8.2. Interakcija aristolohijske kiseline s ciklodekstrinima i goveđim serumom albumina (BSA) i DNA iz telećeg timusa (ct-DNA).....	123
§ 5. ZAKLJUČAK	137
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....	141
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	145
§ 8. DODATAK.....	153
§ 9. ŽIVOTOPIS	161



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

CIKLODEKSTRINI I SAMOUDRUŽENI OLIGOPEPTIDI KAO SUPRAMOLEKULSKI SUSTAVI ZA VEZANJE I CILJANO OTPUŠTANJE BIOMOLEKULA

Nika Gazdek Serdar
Institut Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, 10000 Zagreb

Sintetizirani su derivati aminokiseliniskog slijeda FFA, koji je dio amiloida- β i povezan s Alzheimerovom bolešću te je dokazan uzročnik nastajanja fibrila i time amiloidnih plakova. Sintetizirani derivati FFA s različitim zaštitnim skupinama na N i C krajevima dobri su gelatori otapala poput vode, alkohola i organskih otapala. Molekule gelatora se samoudružuju nekovalentnim interakcijama, ponajviše vodikovim vezama između amidne skupine i karboksilatne skupine, tvoreći vlakna i gelsku mrežu. Iz studije morfologije vidljivo je da gelovi sadržavaju nitastu strukturu nanometarskih dimenzija isprepletenu u trodimenzionalnu mrežu. Peptidni samoudružujući sustavi pokazali su se efektivni kao adjuvantni za cjepiva, a zbog svoje biokompatibilnosti ispitani su i kao sustavi za dostavu lijekova u kombiniranim sustavima s liposomima i biomolekulama. Strukturna karakterizacija takvih sustava provedena je transmisijском elektronskom mikroskopijom (TEM), diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom (DSC) i infracrvenom spektroskopijom (FTIR). Domaćin-gost supramolekulski sustavi s ciklodekstrinima ispitani su za vezanje malih molekula kao antidot za trovanje toksinima.

(163 stranica, 73 slike, 2 sheme, 16 tablica, 219 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: supramolekulski gelovi/liposomi/ciljana dostava/ciklodekstrini/aristolohijska kiselina

Mentor: dr. sc. Leo Frkanec, znanstveni savjetnik u trajnom izboru

Rad prihvaćen: 5. studenog 2025.

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Ines Primožič
2. prof. dr. sc. Snežana Miljanić
3. dr. sc. Nikola Basarić, zn. savj.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

CYCLODEXTRINS AND OLIGOPEPTIDE SELF-ASSEMBLIES AS SUPRAMOLECULAR SYSTEMS FOR BINDING AND CONTROLLED RELEASE OF BIOMOLECULES

Nika Gazdek Serdar
Institut Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, 10000 Zagreb

Derivatives of the amino acid sequence FFA have been synthesized. FFA sequence is part of amyloid- β associated with Alzheimer's disease and has been proven to cause the formation of fibrils and thus amyloid plaques. The synthesized FFA derivatives with various protecting groups at the N and C terminal are good gelators of water and organic solvents. The gelator molecules self-assemble by non-covalent interactions, mostly hydrogen bonds between the amide group and the carboxylate group, creating fibers and a gel network. Morphological studies show that the gels contain a fibrous structure of nanometer dimensions intertwined into a three-dimensional network. Peptide self-assembling systems have proven effective as adjuvants for vaccines, and due to their biocompatibility, they have also been tested as drug delivery systems in combined systems with liposomes and biomolecules. Structural characterization of such systems was carried out by transmission electron microscopy (TEM), differential scanning calorimetry (DSC) and infrared spectroscopy (FTIR). Host-guest supramolecular systems with cyclodextrins were tested for binding small molecules as an antidote for poisoning with toxic molecules.

(163 pages, 73 figures, 2 scheme, 16 tables, 219 references, original in croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: supramolecular gels/liposomes/controlled release/cyclodextrins/aristolochic acid

Supervisor: dr. sc. Leo Frkanec, Senior Scientist

Thesis accepted: 5. November, 2025.

Reviewers:

1. prof. dr. sc. Ines Primožič
2. prof. dr. sc. Snežana Miljanić
3. dr. sc. Nikola Basarić, Senior Scientist

§ 1. UVOD

Nanomedicina omogućuje razvoj novih sustava koji poboljšavaju efikasnost lijekova smanjujući njihove štetne utjecaje. Sinteza i dizajn novih sustava za vezanje i otpuštanje molekula sa specifičnim svojstvima ostaje prioritet u širenju područja nanomedicine.

Supramolekulska kemija u svojim početcima kao i danas nalazi široku primjenu u pripravi novih funkcionalnih materijala kao i elektroničkim, optičkim te senzornim uređajima, a u posljednje vrijeme u medicini i biomedicini u području dostave lijekova, novih podloga za uzgoj stanica i mnogim drugim područjima za poboljšanje kvalitete života. U biološkim sustavima nekovalentne interakcije između biomolekula imaju poseban značaj u organizaciji i udruživanju, kao i u procesima vezanja i molekulskog prepoznavanja prilikom tvorbe bioloških kompleksa. Razvitak supramolekulske kemije, u posljednjih pedesetak godina, otvorio je mogućnost pripreme sintetskih molekula sa svojstvima samoorganiziranja, samoudruživanja i molekulskog prepoznavanja.¹ Jedan od ključnih napredaka u ovom području su supramolekulski sustavi koji se samoudružuju stvaranjem nekovalentnih veza. Procesi samoudruživanja malih organskih molekula temelje se na nekovalentnim interakcijama poput vodikovih veza, π - π interakcija, van der Waalsovih sila, elektrostatskih sila i dr. Takvi sustavi su reverzibilni i osjetljivi na vanjske stimulanse poput pH, temperature ili ionske jakosti.² Organske molekule koje imaju potencijal za stvaranje supramolekulskih struktura često sadrže određene funkcijske skupine koje omogućuju međusobno prepoznavanje uz pomoć nekovalentnih interakcija. Funkcijske skupine koje se često upotrebljavaju u strukturama su amino skupine, karboksilne skupine, alifatski lanci, aromatske skupine i druge. Kao uspješne centralne jedinice za dizajn samoudruženih sustava do sada su najčešće korišteni cikloheksani³, kratki peptidi⁴, porfirini⁵, derivati oksalne⁶ i fumarne kiseline⁷.

Peptidni samoudružujući nanomaterijali su od velikog interesa zbog njihove primjene u biomedicini. Njihova biokompatibilnost, lakoća funkcionalizacije i sposobnost stvaranja trodimenzionalne mreže omogućuje široku biološku primjenu.^{8,9} Područje supramolekulske kemije kojim se bavi ovaj rad je poglavito područje kratkih peptida inspiriranih A β -amiloidnim proteinima te njihovo samoudruživanje u supramolekulske strukture.¹⁰ Kratki peptidi privlače sve veću pažnju zbog svoje jednostavne i jeftinije laboratorijske sinteze. Najkraći poznati dipeptid difenilalanin (Phe-Phe, FF) i njegovi derivati, kao najmanja jedinica β -amiloida,

pokazali su svojstvo samoudruživanja u nanostrukture poput tuba, sfera, nanocijevi i hidrogelova.¹¹⁻¹³ Sklonost proizlazi iz njihove amfifilnosti te sklonosti stvaranju β -nabranih ploča.^{14,15} Nastajanje sekundarnih struktura moguće je okarakterizirati i pratiti bojama poput tioflavina T koja prepoznaje amiloidne fibrile pri čemu dolazi do pojačavanja fluorescencije te se može pratiti *in vitro* i *in vivo*, a sve više se istražuju nove boje za praćenje nastajanja sekundarnih struktura.^{16,17} Ultrakratki peptidni hidrogelatori, od samo dvije do tri aminokiseline, ističu se zbog svoje jednostavne sinteze, mogućnosti sinteze većih količina (engl. *scale-up*) i jeftine sinteze. Neki od najčešće korištenih spojeva za pripravu gelova su polimeri polilaktidna kiselina (PLA), poliglikolid (PGA), kopolimer polilaktično-glikolna kiselina (PLGA) i kitosan koji se sve više kombiniraju s prirodnim peptidnim gelatorima.⁴ Neki od peptidnih hidrogelova podržavaju rast stanica i kontrolirano otpuštanje malih molekula zbog čega su idealni kandidati za biomedicinsku primjenu.¹⁸⁻²² Peptidni hidrogelovi ne zahtijevaju korištenje štetnih materijala za inicijaciju promjene iz otopine u gel, te sadrže prirodne aminokiseline koje se mogu metabolizirati zbog čega se supramolekulski gelovi proučavaju u svrhu poboljšane ciljane dostave lijekova.²³

Određeni hidrogelovi pokazali su mogućnost učinkovite ugradnje i kontroliranog otpuštanja različitih hidrofilnih i hidrofobnih terapijskih molekula kao što su nukleinske kiseline, proteini i protutijela. Također, idealni hidrogelovi za *in vivo* dostavu lijekova trebali bi biti topikalni što bi omogućilo aplikaciju injektiranjem te bi trebali pokazati stabilnost kroz nekoliko dana u tjelesnim tekućinama i tkivima kako bi mogli postepeno otpuštati lijek. Količina i homogenost lijeka ugrađenog u hidrogel može biti ograničena, posebno u slučaju hidrofobnih lijekova. Visoki sadržaj vode i velike pore većine hidrogelova često dovode do relativno brzog otpuštanja lijeka, što može dovesti do lokalnog nakupljanja lijeka i toksičnih posljedica.

Liposomi se intenzivno koriste za istraživanje osnovnih svojstava stanica i staničnih membrana, a pokazali su se kao dobri sustavi za ciljanu dostavu lijeka i istraživanje staničnog prepoznavanja.²⁴ Dvokomponentni sustav nastaje procesom samoudruživanja dvaju nezavisnih supramolekulskih sustava.²⁵ Integracija liposoma i hidrogela jedan je od načina za smanjenje neželjenih učinaka koji se javljaju kod upotrebe samo jednog od ovih sustava.^{21,26} Inkorporiranje lipidnih nosača poput liposoma u hidrogel omogućuje kontrolirano otpuštanje lijeka ili antigena pri čemu povećavaju bioraspoloživost takvih sustava.^{21,25-29} Novije studije ističu potencijal peptidnih nanomaterijala kao obećavajućih sustava za cjepiva, pripisujući to

njihovim snažnim adjuvantskim aktivnostima i sposobnosti aktivacije imunološkog sustava i proizvodnje protutijela.³⁰ Neki supramolekulski gelovi pokazali su značajnu imunostimulacijsku aktivnost. U takvim sustavima zamjena ili promjena redoslijeda aminokiselina može značajno umanjiti količinu nastalih protutijela.^{31,32}

Supramolekulski sustavi osim samoudružujućih struktura dijele se i na domaćin-gost kemiju (engl. *host-guest*) gdje se male molekule (gost) vežu u veću molekulu (domaćin) i time stvaraju inkluzijske komplekse. Supramolekulska kemija je započela istraživanjem domaćin-gost sustava s krunskim eterima nakon čega se područje proširilo i na makrocikličke spojeve poput kaliksarena, kukurbiturila i drugih. Istraživanja inkluzijskih kompleksa proširila su se i na druge skupine spojeva pa su veliku pažnju privukli ciklodekstrini kao domaćini zbog svoje cijene, dobre topljivosti i velike mogućnosti kemijske modifikacije ciklodekstrina.³³⁻³⁵ Kompleksiranje lijekova i ciklodekstrini se svakodnevno istražuju u svrhu poboljšanja topljivosti lijekova. Osim toga, primjena lijekova u medicini koji mogu izazvati neželjene nuspojave (mučnina, besvjestica, vrtoglavica) u prekomjernim dozama potaknula je znanost na istraživanje sustava za kontroliranu administraciju važnih antidota kojima bi se poništili štetni efekti. Veliki broj lijekova imaju toksična svojstva te pripadaju malim molekulama koje se mogu vezati u šupljine makrocikla ili domaćina i time stvarati inkluzijske komplekse.³⁶

Osnovni cilj ovog istraživanja bio je istražiti supramolekulske sustave s posebnim naglaskom na pripravu novih funkcionalnih samoudruživih materijala s biološkim aplikacijama, usmjerenim prema skladištenju, kontroliranom otpuštanju i/ili vezanju lijekova. Fokus istraživanja temeljen je na molekulskim samoudruženjima, poput hidrogelova, inspiriranih vlaknastim biološkim agregatima (amiloidni fibrili). Sintetizirani su, klasičnim sintetskim metodama, kratki peptidi koji sudjeluju u stvaranju samoudruženih struktura, s aminokiselinskim slijedom fenilalanin-fenilalanin-alanin (Phe-Phe-Ala, FFA) i različitim zaštitnim skupinama na N i C krajevima. Za sintezu su korišteni različiti aminokiselinski derivati i reagensi uobičajeni u peptidnoj kemiji. Strukture spojeva potvrđene su ¹H i ¹³C NMR te infracrvenom spektroskopijom s Fourierovom transformacijom (FTIR), elementnom analizom i masenom spektrometrijom. Morfologija gelskih niti određena je transmisijском elektronskom mikroskopijom (TEM) i mikroskopijom atomskih sila (AFM). Ispitani su hidrogelovi kao kompozitni supramolekulski sustavi temeljeni na hidrogelatoru, s ugrađenim liposomima, u koji je ugrađen lijek te koji predstavlja novi sustav za poboljšanu dostavu lijeka. Ugradnja i otpuštanje lijeka ispitano je ultraljubičasto-vidljivom (UV-Vis) apsorpcijskom i

fluorescencijskom spektroskopijom, a hidrogelovi kao i kompozitni materijali su karakterizirani diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom (DSC) i FTIR spektroskopijom. Dodatno, u istraživanju suprotnog principa, izoliranja i izdvajanja bioaktivnih malih molekula iz biološki relevantnih otopina, ispitani su inkluzijski kompleksi ciklodekstrina. Selektivno vezanje gosta u ciklodekstrin proučavano je UV-Vis apsorpcijskom i fluorescencijskom spektroskopijom te izotermalnom titracijskom kalorimetrijom (ITC).

U okviru navedenih istraživanja potvrđene su postavljene hipoteze. Sintetizirani supramolekulski sustavi temeljeni na FFA peptidu pokazuju snažnu imunostimulacijsku aktivnost i predstavljaju novu generaciju sustava za dostavu cjepiva s adjuvantskim svojstvima. Nadalje, kompozitni sustav hidrogela FFA i liposoma predstavlja poboljšani sustav za dostavu i kontrolirano otpuštanje lijekova. Također, rezultati ispitivanja kompleksiranja ciklodektrina s aristolohijskom kiselinom, potvrdili su njihovu učinkovitost kao antidota.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Supramolekulska kemija

Nanotehnologija, koja se temelji na intermolekulskim organizacijama molekula ili atoma, privlači veliki broj znanstvenika zbog mogućnosti formiranja različitih struktura i geometrija koje usmjeravaju funkcijske skupine i sile međuatomskih i međumolekulskih interakcija.³⁷

Supramolekulska kemija bavi se multikomponentnim sustavima atoma, molekula i/ili iona koji se međusobno povezuju nekovalentnim interakcijama poput vodikovih veza, van der Waalsovih sila, hidrofobnih i hidrofilnih interakcija, π - π interakcija i dr. Karakterizira ih međusobno prepoznavanje molekula koje se nekovalentnim interakcijama udružuju u nove funkcionalne sustave.³⁸ Inspiracija za razvoj supramolekulskih sustava pronalazi se u prirodi, osobito u živim organizmima i biokemijskim procesima koji se odvijaju unutar stanica, poput kompleksa enzim–supstrat, strukture DNA te međusobnih interakcija proteina.³⁹ Enzimi djeluju analogno supramolekulskim domaćin–gost sustavima, prema modelu „ključa i brave“, pri čemu dolazi do stvaranja specifičnih kompleksa. Sama enzimatska i proteinska struktura pritom predstavlja primjer samoudruživanja molekula nekovalentnim interakcijama.⁴⁰ Molekula DNA je primjer gdje se dvolančana dvostruka uzvojnica DNA povezuje uz pomoć vodikovih veza između komplementarnih nukleinskih baza tvoreći tako temelj života na Zemlji.⁴¹ Komponente u supramolekulskom sustavu mogu biti raznih struktura, oblika te na različite načine povezane. Može se zaključiti kako postoje velike mogućnosti kombiniranja i povezivanja molekula s ciljanim svojstvima koji proizlaze iz svojstava pojedinih komponenti u tom sustavu te novim svojstvima kao rezultat preciznog kombiniranja komponenata supramolekulskog sustava. Nova svojstva će ponajviše ovisiti o dizajnu pojedinih komponenti, to jest, ako postoji komponenta akceptor vodikovih veza i donor vodikovih veza, tada je velika vjerojatnost povezivanja dviju takvih molekula. Preciznim odabirom funkcijskih skupina mogu se predvidjeti interakcije i načini povezivanja molekula u sustavima. Sekundarni čimbenici koji utječu na interakcije su otapalo, agregacijsko stanje sustava, ionska jakost (I) i mnogi drugi. Slabe veze u takvim sustavima čine ih osjetljivijim na fizikalne promjene (promjena temperature, pH, oksidacija ili redukcija) te je potrebna manja energija za cijepanje takve veze, za razliku od kovalentne. Iako svi supramolekulski sustavi mogu pokazati svojstvo reverzibilnosti pod utjecajem različitih vanjskih utjecaja, važno je naći optimalne uvjete poput pogodnog otapala, temperature, pH,

ionske jakosti i drugih faktora koji omogućavaju upravljanje supramolekulskim strukturama i njihovu primjenu u različitim područjima.⁴² U supramolekulske sustave spadaju supramolekulski gelovi i domaćin-gost (*engl. host-guest*) sustavi.⁴³

2.2. Molekulsko samoudruživanje

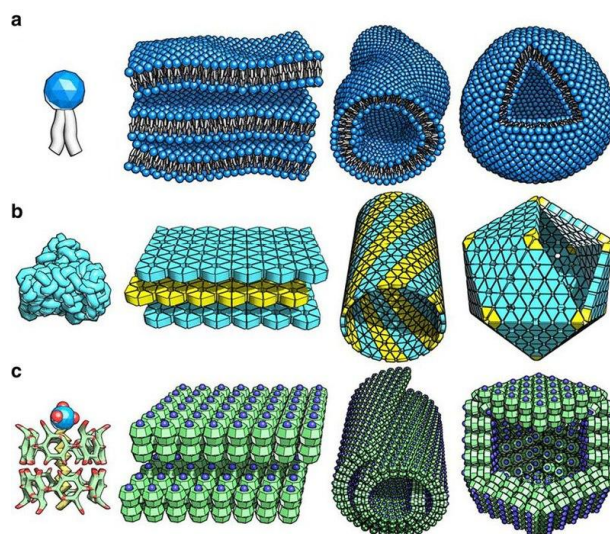
Molekulsko samoudruživanje je karakterističan proces molekula unutar supramolekulskih gelova. U ovom dijelu objasniti će se поближе proces samoudruživanja jer je to temelj znanstvenog istraživanja ove disertacije. Molekulsko samoudruživanje je spontani i reverzibilni proces kojim molekule ili ioni tvore velike i kompleksne supramolekulske sustave (slika 1). Sintaza supramolekulskih sustava inspirirana je primjerima iz prirode. Istraživanja u ovom području pokrivaju sustave koji sadrže biomolekule poput proteina, nukleinskih kiselina, peptida koji molekulskim udruživanjem stvaraju nove, dizajnirane sintetske materijale.⁴⁴ Molekulskim samoudruživanjem mogu se dobiti željene strukture i svojstva materijala organizacijom i dizajnom molekula intramolekulskim i intermolekulskim interakcijama, paralelno kontrolirajući samoudruživanje izborom odgovarajućeg medija (otopine). Kao što je spomenuto, proces samoudruživanja je određen nekovalentnim interakcijama uključujući elektrostatske interakcije, vodikove veze, π - π interakcije, van der Waalsove interakcije i solvofobne efekte. Neovalentne interakcije su većinom energijski slabe interakcije, no u velikom broju u supramolekulskim sustavima sudjeluju u dinamici, čvrstoći i ravnoteži sustava. Solvofobni efekti se moraju uzeti u obzir kada se proces samoudruživanja događa u otopalu. Tipične neovalentne interakcije poput vodikovih veza u vodi slabije su zbog polarnog karaktera vode i konkurentnih vodikovih veza u odnosu na hidrofobni efekt. Hidrofobni efekt se može prikazati kao kombinacija nekovalentnih interakcija kao što su dipol-dipol interakcije, vodikove veze ili van der Waalsove interakcije zajedno s entropijskim i entalpijskim učincima dehidracije lipofilnih površina.⁴⁵

Samoudruživanje se može podijeliti u nekoliko kategorija⁴⁶:

- reverzibilno samoudruživanje (engl. *strict self-assembly*) – samoudruživanje koje nastaje spontanim procesima pod utjecajem temperature, pH, koncentracije itd.
- predmodifikacijsko samoudruživanje (engl. *precursor modification followed by self-assembly*) – samoudruživanje u kojoj komponente ne sudjeluju u samoudruživanju dok se kemijski ne modificiraju
- postmodifikacijsko samoudruživanje (engl. *self-assembly with postmodification*) – reverzibilno samoudruživanje koje se postmodificira kovalentnim vezama i time se zaključava struktura
- potpomognuto samoudruživanje (engl. *assisted self-assembly*) – upotreba katalizatora za ostvarivanje samoudruživanja
- usmjereno samoudruživanje (engl. *directed self-assembly*) – za samoudruživanje potrebna je šablonska struktura u kojoj će se molekule samoudružiti
- kombinirano samoudruživanje (engl. *self-assembly with intermittent processing*) – kombinacija prethodnih samoudruživanja

Svojstva samoudruživih sustava su:

- dinamičnost i mogućnost raznih kombinacija s različitim gradivnim jedinicama
 - uređenost strukture
 - dobar odgovor na vanjske utjecaje
 - mogućnost samoispravka (engl. *self-healing*)
 - mogućnost samoreplikacije (engl. *self-replication*)
-

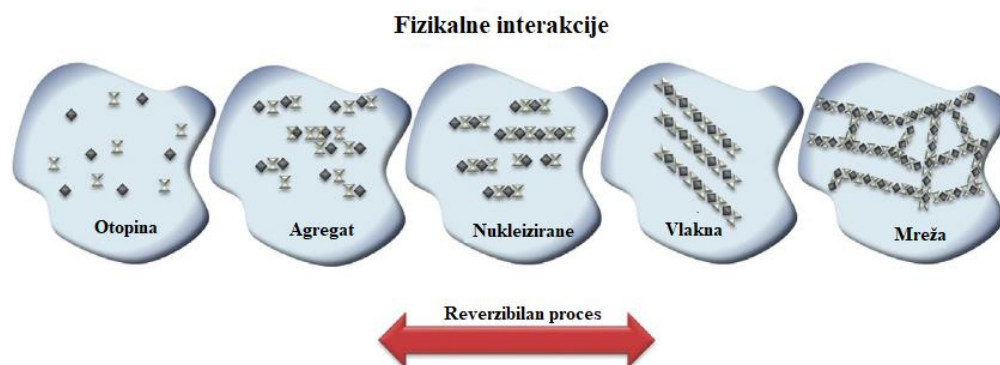


Slika 1. Samoudruživanje molekula u supramolekulske strukture a) lipidi, b) proteini, c) ciklodekstrinski kompleks (ilustracija preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru).⁴⁷

2.2.1. Supramolekulski hidrogelovi

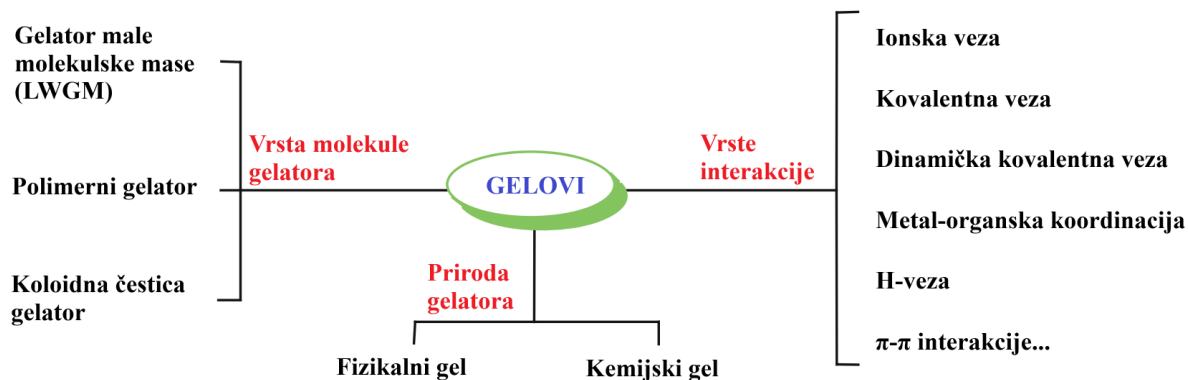
Gelovi se definiraju kao znatno razrijeđeni umreženi sustavi koji ne pokazuju protočnost u stacionarnom stanju.⁴⁸ Strukturna i elektronska kompleksnost ovakvih gelova otvaraju vrata raznim modifikacijama i dobivanju materijala s reverzibilnim svojstvima. Najveća inspiracija za nove materijale dolazi iz prirode gdje se nastoji oponašati ponašanje prirodnih spojeva zbog čega su osnovne komponente gelova aminokiseline, steroidi, peptidi, alkilni dugački lanci, saharidi, masne kiseline, aromatski fragmenti, organske soli i domaćin-gost sustavi.³⁷ Gelovi su u svakodnevnoj upotrebi u različitim oblicima. Nalazimo ih u obliku komercijalno dostupnih proizvoda poput sapuna, šampona, zubne paste, gela za kosu i drugih kozmetičkih proizvoda, kao i u dioptrijskim lećama, a velika primjena je i u medicini za ciljanu dostavu lijekova, obnovu tkiva i dr. Supramolekulski gelovi sastoje se od trodimenzionalne mreže koja nastaje samoudruživanjem molekula unutar koje se nalazi zarobljeno otapalo (organsko = organogel ili voda = hidrogel). Proces geliranja započinje na nano skali gdje molekule gelatora započinju samoudruživanje u vlaknaste forme putem intermolekulskih nekovalentnih interakcija. Imobilizacijom velikih organskih molekula otapala ili molekula vode sprječavaju njihovo gibanje stvarajući trodimenzionalne mreže pri čemu nastaju viskoelastični reverzibilni materijali. Osnovna podjela supramolekulskih gelova je na fizikalne i kemijske gelove. Fizikalni gelovi su termoreverzibilni i temelje se na nekovalentnim interakcijama, dok kemijski gelovi nastaju kovalentnim povezivanjem molekula tvoreći s otapalom termoreverzibilnu

mrežu koja može još navući na sebe određenu količinu otapala procesom bubrenja. Prema molekuli koja uzrokuje geliranje razlikujemo: organske molekule male molekulske mase, velike organske molekule, polimerne molekule, metalogelove (u metalogelovima metalni ion djeluje kao supstitucijska inertna strukturalna ili funkcionalna komponenta, dajući čvrstoću ili fotofizička, magnetska ili redoks svojstva gelu.) (slika 2).^{49,50}



Slika 2. Molekularno samoudruživanje od otopine do 3D mreže (ilustracija preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru).^{43,51}

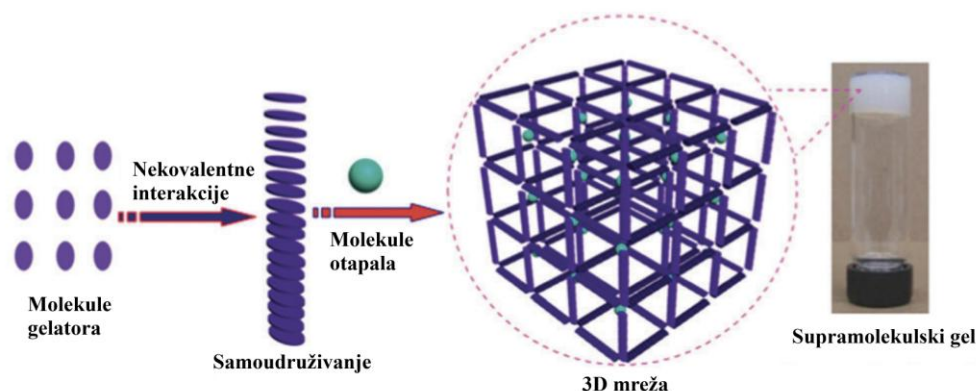
Glavna komponenta gelova su gelatori (molekule koje geliraju) koji mogu biti male molekule, polimeri, anorganske čestice ili koloidne čestice (slika 3). Najveći dio, 99 % gela je otapalo.⁴⁹ Ovisno o otapalu gelovi se dijele na organogelove i hidrogelove.⁵²



Slika 3. Klasifikacija gelova prema prirodi gelatora, vrsti interakcija te vrsti molekule gelatora (ilustracija preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru).⁴⁹

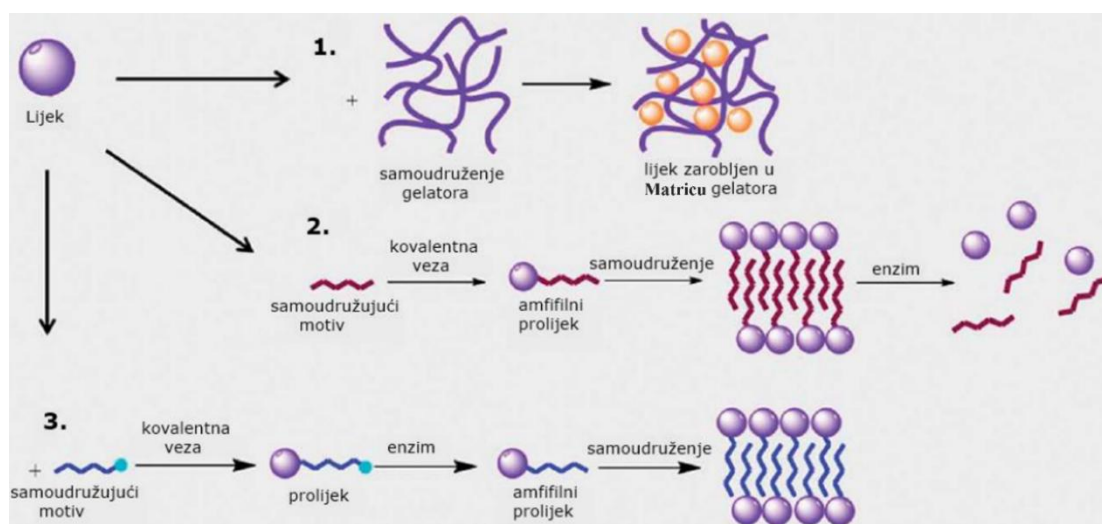
Stvaranje veze najčešće započinje zasićenom otopinom (slika 4).⁵³ Jake vodikove veze, poput onih prisutnih u ureji i amidima, dovode do stvaranja vlaknastih struktura. Osim toga, na formiranje supramolekulskih sustava utječe i velik broj drugih čimbenika, kao što su π - π interakcije, donor–akceptor interakcije, metalna koordinacija, solvofobne sile (hidrofobne sile

u gelovima na bazi vode), kao i van der Waalsove interakcije te drugi nekovalentni učinci. Strukture izvijanjem i ispreplitanjem stvaraju trodimenzionalne mreže gelova.



Slika 4. Stvaranje gela (ilustracija preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru).⁵³

Supramolekulski gelovi imaju široku primjenu u području inženjerstva tkiva i zaraštavanja rana, ciljanoj dostavi lijekova, stvaranju matrica, molekularnoj elektronici, senzorima i dr.^{54,55} Velika prednost supramolekulskih gelova je njihova reverzibilnost uvjetovana djelovanjem nekovalentnih interakcija u mrežastoj strukturi gela. Reverzibilnost se kontrolira vanjskim stimulansima poput pH, temperature, iona, mehaničkog stresa. Reverzibilnost proširuje mogućnost uporabe supramolekulskih gelova u regenerativnoj medicini^{56,57}, ciljanoj dostavi lijekova⁵⁵ (slika 5), senzorima⁵⁸, kozmetici, hrani i dr.⁵⁹

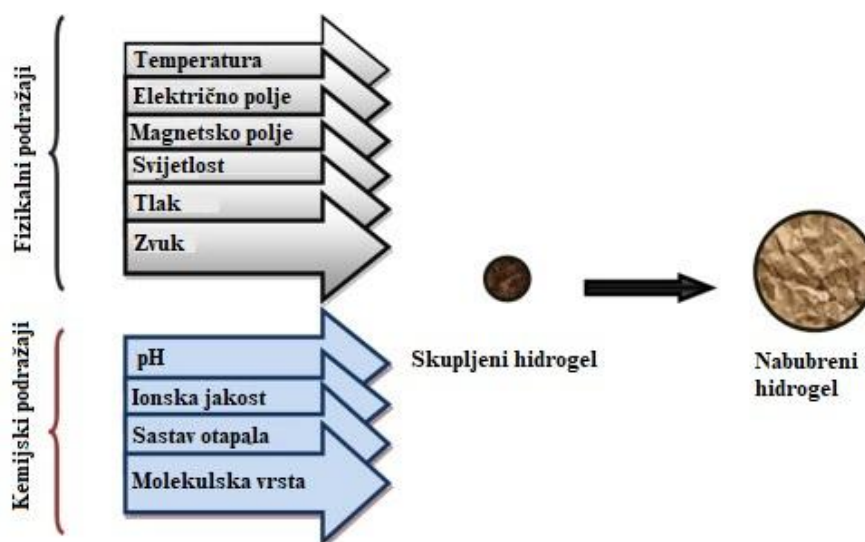


Slika 5. Tipovi sustava za ciljanu dostavu lijekova: 1.- supramolekulski gelovi, 2.- kovalentno vezanje na nosače s enzimskim otpuštanjem, 3.- kovalentno vezanje na intermedijarne prolijeke i enzimski inducirano samoudruživanje (ilustracija preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru).⁵⁷

Supramolekulski gelovi se najčešće dobivaju zagrijavanjem gelatora u pripadajućem otapalu te hlađenjem smjese na sobnu temperaturu. Hlađenjem smjese molekule se počnu povezivati te su moguća tri ishoda:

- 1) Kristalizacija – uređena agregacija gdje nastaju strukture poput kristalne
- 2) Nasumična agregacija gdje se dobiva amorfnu precipitat
- 3) Gel se dobije mješavinom 1) i 2) procesa, to jest „zakočenom“ kristalizacijom (ili inhibiranom kristalizacijom) – tijekom procesa formira se čvrsta faza te dolazi do prekida ili usporavanja rasta kristala zbog čega se stvara nitasta ili mrežasta struktura.

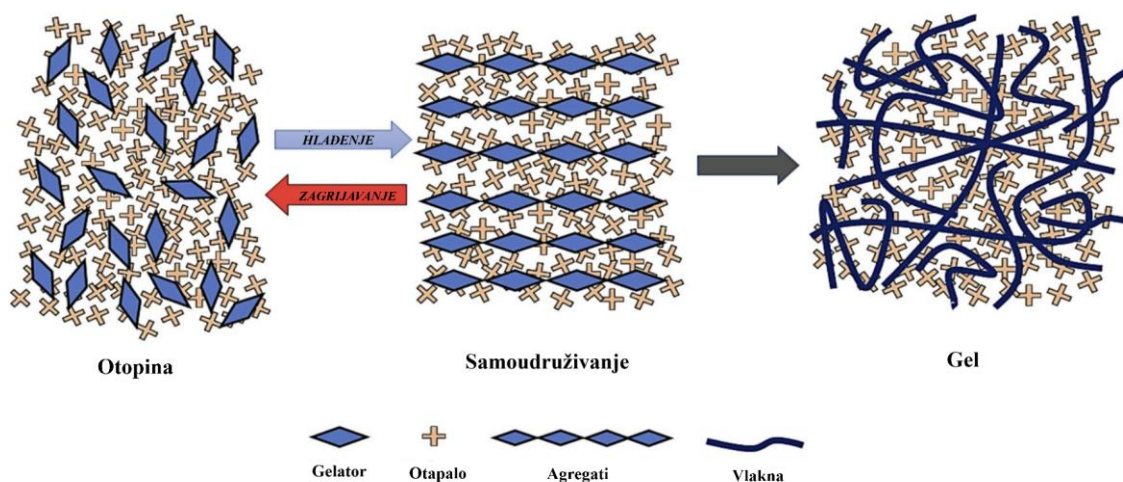
Hidrogelovi su gelovi koji se sastoje od gelatora te vode koja je imobilizirana u trodimenzionalnu strukturu polimernih lanaca. Svojstvo hidrogelova da apsorbiraju vodu potječe od hidrofilnih funkcijskih skupina. Ovisno o željenim svojstvima hidrogelovi mogu biti biorazgradivi, mehanički stabilniji te imati kemijsku i biološku osjetljivost na vanjske podražaje.⁶⁰ Hidrogelovi se mogu podijeliti ovisno o izvoru na prirodne i sintetičke gelove⁶¹ Hidrogelovi mogu imati reverzibilno svojstvo bubrenja ili skupljanja u prisutnosti vode mogu se dizajnirati da bubre ili se skupljaju u ovisnosti o vanjskim uvjetima. Vanjski uvjeti mogu biti fizikalni (temperatura, električno polje, svjetlost, tlak, zvuk) ili kemijski (pH, otapalo, ionska jakost, molekulska vrsta) (slika 6).⁶²



Slika 6. Vanjski podražaji koji utječu na bubrenje/skupljanje hidrogelova (ilustracija preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru).⁶²

Hidrogelovi imaju široku primjenu u higijenskim proizvodima, poljoprivredi, ciljanoj dostavi lijekova, proizvodnji umjetnog snijega, aditivima za hranu, farmaceutskim proizvodima, biomedicini, inženjerstvu tkiva i regenerativnoj medicini, dijagnostici, biosenzorima i dr.⁶⁰

Glavna tema ovog doktorskog rada su fizikalni (termoreverzibilni) supramolekulski peptidni hidrogelatori s naglaskom na gelove organskih molekula male molekulske mase (LWGM) u vodi. Osnovni preduvjeti da neka molekula male molekulske mase bude gelator su funkcijske skupine koje ostvaruju nekovalentne interakcije te djelomična topljivost u otapalu. Kako je prethodno spomenuto, takve organske molekule, da bi ostvarile nekovalentne interakcije, moraju imati funkcijske skupine podložne vezanju nekovalentnim interakcijama poput vodikovih veza ($C=O \cdots HN$), hidrofobnih interakcija (alkilni lanci), π - π interakcija (aromatske skupine) i dr.^{63,64} Grijanjem suspenzije dolazi do otapanja molekule gelatora i homogenizacije otopine. Prilikom hlađenja molekulskim prepoznavanjem molekule nekovalentnim interakcijama stvaraju nove strukture. Prelaskom iz 1D strukture, poput niti, daljnjim samoudruživanjem molekule se intermolekulsko povezuju u 3D strukture tj. trodimenzijsku mrežu (slika 7a). Prilikom nastajanja 3D strukture molekule otapala ostaju zarobljene u međuprostoru gelske mreže. Potvrđivanje gelske strukture provodi se inverznim testom, odnosno, okretanjem bočice naopako (slika 7b).



a)



b)

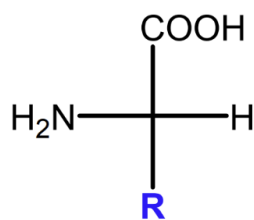
Slika 7. Postupak nastajanja gela fizičkim procesom (a) i inverzni test (b) (ilustracija preuzeta i prilagođena pema literaturnom izvoru).⁶⁵

Najjednostavnija spektroskopska metoda analize gelova je temperaturno ovisna spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (NMR)⁶⁶ i infracrvena spektroskopija (FTIR).⁶⁷ NMR i FTIR tehnikama mogu se detaljnije opisati promjene unutar gelske strukture proučavajući interakcije u sol-gel stanjima, odnosno tijekom hlađenja i zagrijavanja. Sekundarne strukture i strukture višeg reda tj. samoudruživanje gelatorskih molekula može se ispitivati i UV-Vis apsorpcijskom spektroskopijom ako molekula gelatora sadrži kromoforne funkcijske skupine. Spektroskopijom cirkularnog dikroizma (CD) može se ispitivati i uočiti kiralnost ili heličnost gelskih vlakana⁶⁸. FTIR tehnika je široko primjenjiva u karakterizaciji peptidnih gelova jer prikazuje vibracijske vrpce amidnih skupina (amid I i amid II) koje daju vrijedne informacije o

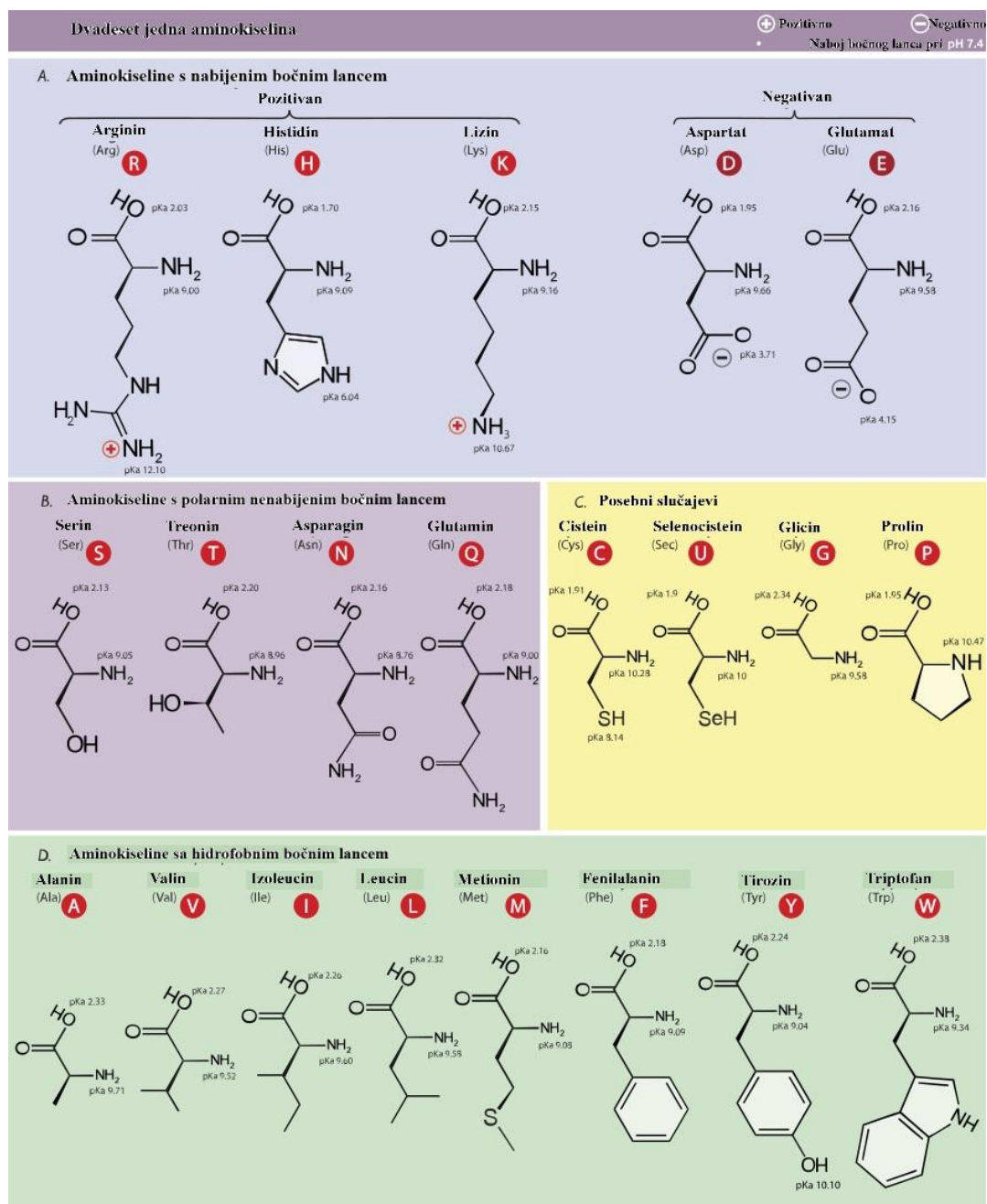
sekundarnoj strukturi gelatorskih molekula i organizaciji fibrila i vlakana koje stvaraju 3D gelske mreže.^{69,70} Proučavanje gelova na mikroskopskoj razini provodi se tehnikama pretražne elektronske mikroskopije (SEM), transmisijske elektronske mikroskopije (TEM) te mikroskopije atomskih sila (AFM) kojima se promatra morfologija gelova dok se pomoću termalnih i mehaničkih studija objašnjavaju interakcije između struktura. Supramolekulski gelovi proučavaju se i rendgenskom difrakcijskom analizom (engl. *X-ray diffraction*, XRD) te tehnikom raspršivanja rendgenskih zraka pod malim kutem (engl. *X-ray scattering*, XRS) (SANS, SAXS) tehnikama.^{71,72}

2.3. Molekulsko samoudruživanje peptida i peptidni gelovi

Aminokiseline su skupina vrlo važnih biomolekula koje su građene od amino skupine ($-\text{NH}_2^+$) i karboksilne skupine ($-\text{COOH}$). Većina prirodnih aminokiselina su α -aminokiseline. Sve prirodne α -aminokiseline (osim glicina) imaju četiri različita supstituenta na α -C atomu zbog čega spadaju u kiralne molekule. Kiralnost je svojstvo molekule da nema nikakvu ravninu simetrije niti rotacijsku ni refleksijsku točku. Većina aminokiselina iz prirode imaju L-konfiguraciju, dok su pripadajući stereoizomeri D-konfiguracije. Iako je otkriveno i sintetizirano stotinu različitih aminokiselina, 20 aminokiselina se izdvajaju kao najčešće aminokiseline (slika 8b).⁷³



a)



b)

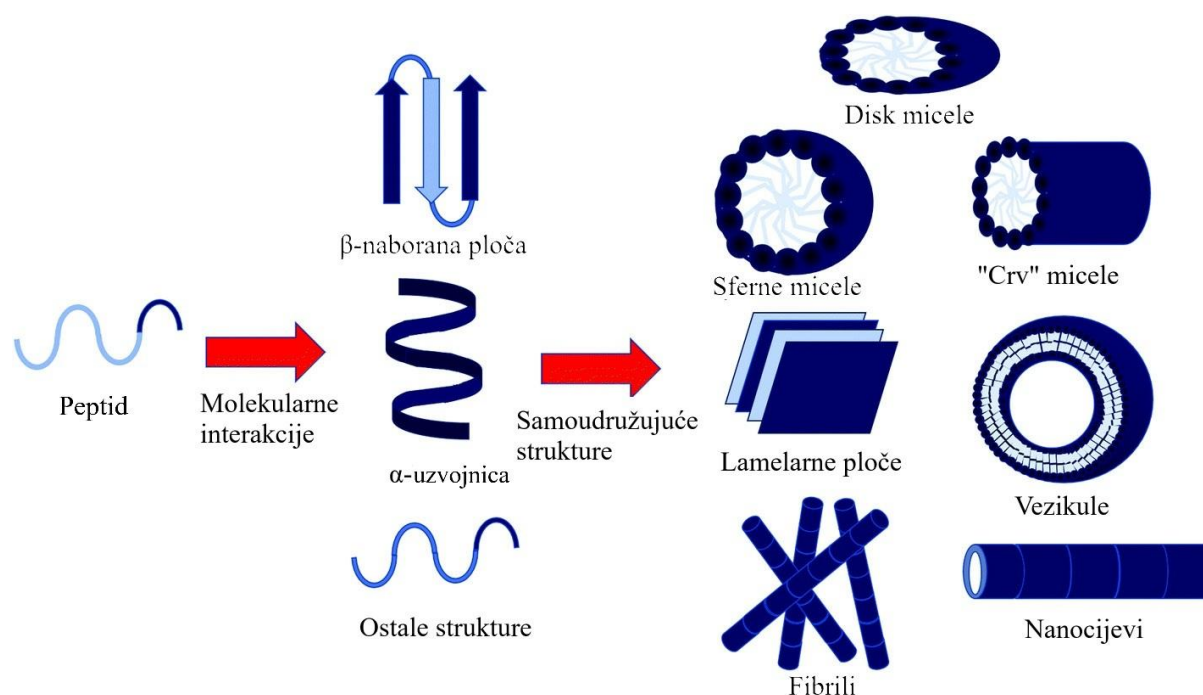
Slika 8. a) Fischerova projekcija aminokiseline, b) Prirodnih 21 aminokiselina koje se najčešće pojavljuju.^{74,75}

Veličinu, oblik i kemijska svojstva aminokiselina određuju bočni lanci (R, slika 8a). Bočni lanci aminokiselina imaju različita svojstva te ih možemo podjeli u tri osnovne grupe:

- s nepolarnim bočnim lancima (Gly, G; Ala, A; Val, V; Leu, L; Ile, I; Met, M; Phe, F; Trp, W; Pro, P)
- s polarnim bočnim lancima (Ser, S; Thr, T; Cys, C; Tyr, Y; Asn, N; Gln, Q)
- s nabijenim bočnim lancima (Asp, D; Glu, E; Lys, K; Arg, R; His, H).

Različiti bočni lanci drugačije doprinose fizikalnim svojstvima. Tako aromatske aminokiseline (F, W, Y) omogućuju π - π interakcije između aromatskih prstenova, dok nepolarni bočni ogranci sudjeluju u hidrofobnim interakcijama. Nabijene aminokiseline stvaraju dipol-dipol interakcije između suprotnih naboja, približavajući tako molekule zajedno, dok isti naboji odbijaju molekule jednu od druge, iako postoje i iznimke. Postoje i aminokiseline koje imaju specifična svojstva kao histidin (H) koji može vezati katione metala, a cistein (C) sadržava tiolnu skupinu (SH) koja može sudjelovati u umrežavanju intra- i intermolekulskim disulfidnim vezama.⁷⁶

Proteini su molekule sa više povezanih aminokiselina pomoću peptidnih veza između N i C kraja. Savijanje proteina omogućuju hidrofobne bočne skupine. Hidrofobne aminokiseline su fenilalanin (F), metionin (M), izoleucin (I), leucin (L) i valin (V).⁷⁷⁻⁷⁹ Supramolekulski hidrogelovi dobiveni iz zaštićenih aminokiselina ili kratkih peptida sve više postaju popularni biomaterijali zbog svoje jednostavne i jeftine proizvodnje kao i zbog kompatibilnosti s biološkim sustavima.⁸⁰ Samoudruživanjem peptida moguće je dobiti različite strukture od vezikula, micela, do fibrila i nanocijevi (slika 9).⁸ Jedini zabilježen sustav jedne aminokiseline s gelirajućim svojstvima je fenilalanin (F) zbog aromatske strukture i hidrofobne prirode.^{81,82} U vodenim otopinama aromatske interakcije i vodikove veze imaju glavnu ulogu u samoorganizaciji gelova male molekulske mase (engl. *Low molecular weight gels (LMWG)*) kao i njihovih derivata i polimera.⁸³ Hidrogeliranje molekula poput aminokiselina može se poboljšati rigidnim i aromatskim N-zaštitnim skupinama koje smanjuju topljivost u vodenim otopinama i potiču hidrofobne interakcije koje izazivaju samoudruživanje. Do danas, opisane su razne mogućnosti zaštitnih skupina od čega je fluorenilmetiloksikarbonil (Fmoc) najčešće upotrebljavana, te derivati naftalena.⁸⁴ Mali peptidni hidrogelovi nalaze svoju primjenu u dostavi lijekova te bioaktivnim materijalima poput materijala za liječenje opekotina kod dijabetičara.⁸⁵ Kraći peptidi lakše se intetiziraju što smanjuje troškove sinteze i povećava mogućnost sinteze većih količina (engl. *scale-up*).⁸⁶

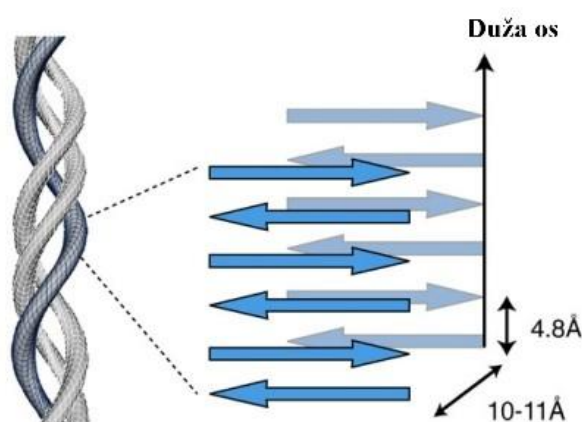


Slika 9. Primjer supramolekulskih peptidnih struktura nastalih molekulskim samoudruživanjem (ilustracija preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru).⁸

Istraživanja molekulskog samoudruživanja kratkih peptida u Hrvatskoj započela su tijekom 1990-ih godina u Laboratoriju za supramolekulsku i nukleozidnu kemiju Instituta Ruđer Bošković, pod vodstvom akademika Mladena Žinića.⁸² Znanstvena istraživanja nastavljaju se u istraživačkoj grupi dr. sc. Lea Frkanca, koja se već godinama bavi istraživanjima u području supramolekulske kemije. Istraživanja su doprinijela prvenstveno razvoju kemije supramolekulskih samoudruživanja i nanomaterijala, poput gelova male molekulske mase (LMWG), primjenom oksalamidne, fumarinske jedinice i raznih aminokiselina. Pokazali su se kao veoma efikasni organizacijski elementi u dizajnu gelskog sustava. Posebno, sintetizirani su i istraživani različiti kiralni bis(amino kiselina) i bis(amino alkohol)-oksalamidi kao gelatori male molekulske mase⁶ s naglaskom na objašnjenja stereokemijskih utjecaja i uloge otapala, a dizajnirani su i funkcionalni i kompozitni gelski sustavi. Sintetizirani su mnogi strukturni analozi navedenih aminokiselnih derivata te je dokazano da su ti derivati dobri gelatori organskih otapala, a također su dobri gelatori smjese organskih otapala. U tijeku su istraživanja gelatora koji uključuju odabrane fragmente A β -proteina povezanog s Alzheimerovom bolesti, novih kiralnih gelatora sa središnjom i osnom kiralnosti te istraživanja kompozitnih sustava s gelatorom i biomolekulama.

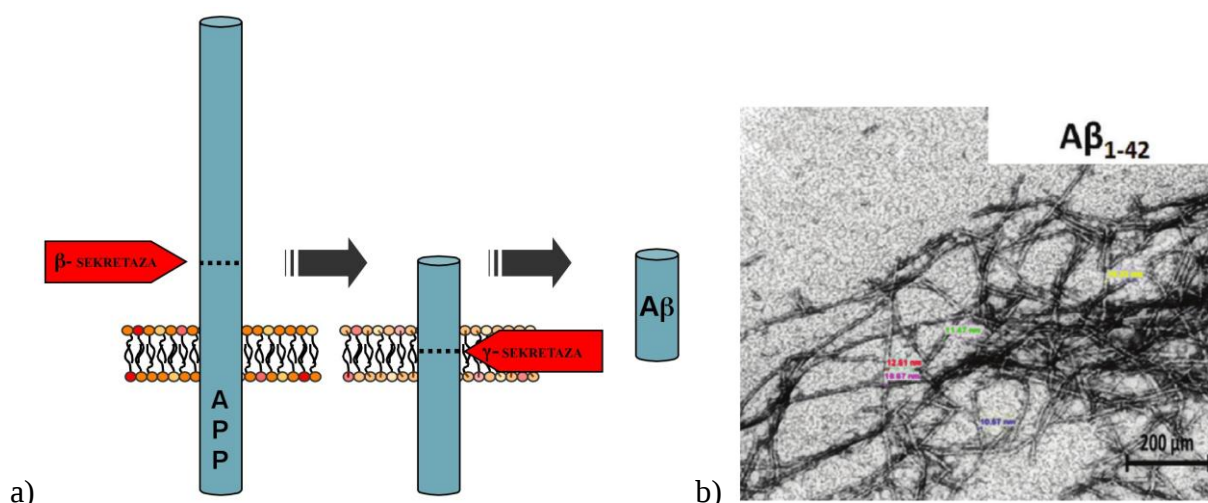
2.4. Bioinspirirani kratki peptidi za istraživanje amiloidne agregacije

Više od 40 milijuna ljudi u svijetu boluje od amiloidnih bolesti koje su uzrok demencije i gubitka pamćenja. Vrlo česte amiloidne bolesti su Alzheimerova bolest, dijabetes tipa 2 i spongiformna encefalopatija poznatija kao „bolest kravljeg ludila“ (engl. *Mad cow disease*). Najugroženija skupina su stariji ljudi (65+ godina), a povećanjem broja starijeg stanovništva raste i broj oboljelih. Obzirom da su Alzheimerova bolest i drugi oblici amiloidnih bolesti usko povezani sa starenjem, a ljudi žive sve dulje, to postaje veliki problem. Iz 2021. godine WHO organizacija objavila je 10 globalnih uzroka smrti od kojih Alzheimerova bolest i ostale demencije zauzimaju 7. mjesto.⁸⁷ Postoje određene terapije koje su pokazale usporavanje napretka Alzheimerove bolesti, no ne postoji lijek koji će je u potpunosti izliječiti zbog čega je znanstvenicima ovo područje od velikog interesa. Glavno obilježje amiloidnih bolesti je nastajanje amiloidnih plakova. Plakovi ometaju normalnu komunikaciju između živčanih stanica, uzrokuju kidanje sinapsi i naposljetku apoptozu odnosno smrt stanica. Takve neurodegenerativne promjene na mozgu se očituju u gubitku pamćenja - demenciji i promjenom ponašanja kod osoba oboljelih od Alzheimerove bolesti. Amiloidni plakovi su nakupine amiloida koje su nastale formiranjem amiloidnih fibrila. Amiloidni fibrili formirani su od inače topljivih proteina koji se udružuju u netopljiva vlakna otporna na degradaciju. Formiranje amiloidnih fibrila je uzrok amiloidnih bolesti od kojih svaka ima specifičan protein ili peptid koji agregira. Amiloidni fibrili nakupljaju se izvanstanično u tkivu te imaju patogeni efekt. Fibrili su inherentno stabilni i strukturna istraživanja pokazala su da se većinom sastoje od β -nabranih ploča u karakterističnom obliku traka postavljenih okomito s obzirom na os niti (engl. *cross β -sheet* tj. poprečne ili savinute β -ploče) (slika 10).^{88,89}



Slika 10. Prikaz β -nabranih ploča amiloidnih fibrila.¹⁶

Sastav amino kiselina i sekvencijska analiza proteina pokazala je da je svaka amiloidna bolest povezana sa specifičnim proteinom ili peptidom.⁹⁰ Do danas je otkriveno 20 proteina koji formiraju amiloide.⁸⁹ Alzheimerova bolest sadrži fibrile nastale samoorganizacijom amiloid- β proteina. Amiloid- β protein ($A\beta$ -protein) je peptid sastavljen od 40-42 aminokiseline. Protein $A\beta$ se formira nakon pravilnog cijepanja amiloidprekursorškog proteina (APP), transmembranskog proteina – proteina koji prolazi kroz staničnu membranu neurona. Velika količina APP prisutna je u središnjem živčanom sustavu na sinapsama između neurona koja sudjeluje kod rasta i preživljavanja neurona te kod oporavka prilikom oštećenja. APP se cijepa pomoću dvaju enzima β - i γ - sekretaze. β -sekretaza prva cijepa APP na derivat sAPP β . Nepocijepani fragment od 99 aminokiselina (CTF β) ostaje vezan za membranu te se cijepa s γ -sekretazom kojom se dobije $A\beta$ -protein. Nepreciznim cijepanjem peptida γ -sekretazom dobiju se različiti peptidni lanci od kojih je najčešći $A\beta$ 40 (80–90 %) i $A\beta$ 42 (5–10 %). Peptid građen od 42 aminokiseline ($A\beta$ 42 peptid) je više hidrofoban i sklon stvaranju fibrila te je glavna vrsta taloga u mozgu (slika 11a,b).^{91,92}



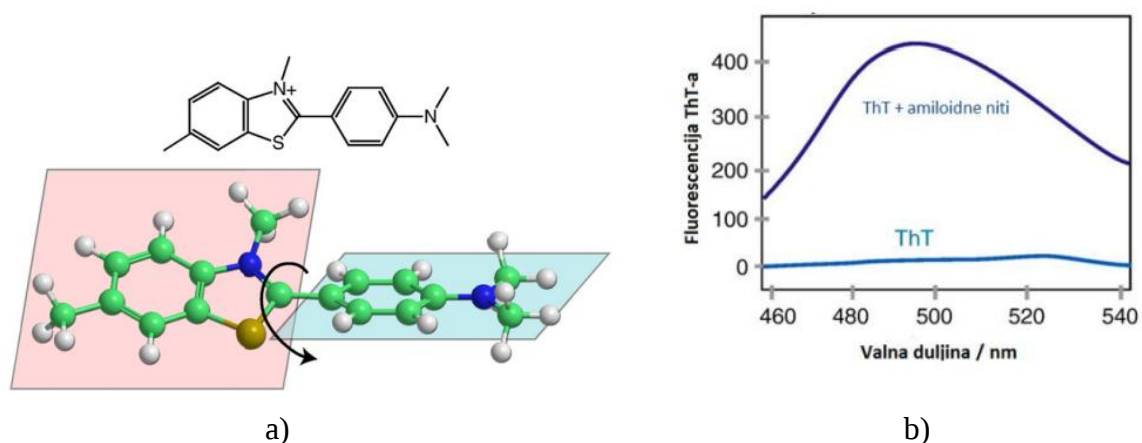
Slika 11. a) Shematski prikaz cijepanja amiloid-prekursorškog proteina do amiloid- β peptida (ilustracija preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru)⁹³ b) Morfologija amiloid beta ($A\beta$) fibrila pod transmisijским elektronskim mikroskopom.⁹⁴

Pojam amiloid se izvorno odnosi na proteinske nakupine slične škrobu (amiloid = „škrobu sličan“). Riječ amiloid danas ima različite definicije zbog prihvatanja svojstva i karakteristika amiloida te proučavanja istih u području biokemije i biofizike te se sve više primjenjuje za sve strukture koje imaju trake postavljene okomito s obzirom na os niti (engl. *cross β -sheet* tj. poprečna ili savinuta β -ploča).⁹⁵

Amiloidi prema nomenklaturi mogu se podijeliti na nekoliko skupina:

- *In vivo* i *ex vivo* fibrili vezani za bolesti
- *In vivo* i *ex vivo* funkcionalni fibrili
- Rekombinantni fibrili proteina povezanih s bolešću i funkcionalnih amiloidnih proteina
- Fibrili iz sintetskih peptida ili peptida koji nisu povezani s bolešću
- Fibrili iz hidrogelova koji daju uzorak svinute β -ploče.

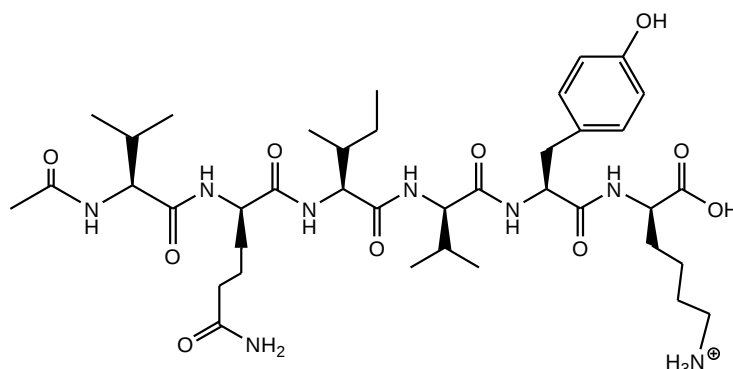
Amiloidni plakovi se u mozgu čovjeka selektivno detektiraju nakon smrti tkivnim bojama od kojih se najčešće primjenjuje fluorescentna histološka boja tioflavin T (engl. *Thioflavin T*, *ThT*). Tioflavin T od svih bojila pokazuje veliko povećanje fluorescencije prilikom vezanja na amiloidne fibrile.⁹⁶ Tioflavin T se sastoji od dimetiliranog benzotiazolnog prstena povezanog s dimetilaminofenilnim prstenom preko C–C veze koja omogućuje rotaciju. Tioflavin T se selektivno veže na β -nabrane ploče amiloidnog peptida. Vezanjem tioflavina T dolazi do onemogućavanja rotacije pri čemu se javlja fluorescencija (slika 12).⁹⁷



Slika 12. a) Kemijska struktura tioflavina T i rotacija dvaju dijelova tioflavina T oko C–C veze; b) Karakteristično povećanje fluorescencije tioflavina T pri vezanju na amiloidne niti.¹⁶

Recentna istraživanja opisuju nove spojeve koji pokazuju slična svojstva tioflavinu T pojačavanjem intenziteta ili gašenjem intenziteta fluorescencije u prisutnosti amiloidnih fibrila. Također, novi spojevi oponašaju strukturu tioflavina T te se ispituju i koriste kao potencijalni inhibitori agregacije amiloida ili za detekciju plakova.⁹⁸⁻¹⁰⁰

Fokus u ovom doktoratu je na skupinu fibrila koji imaju mogućnost stvaranja hidrogelova odnosno na kratke sekvence peptida (tripeptidi) inspirirane fibrilima koji mogu stvarati hidrogelove. Istraživanja amiloidnih agregacija pokazala su da su mali fragmenti proteina odgovorni za agregiranje. Mali fragmenti proteina su laki za sintezu zbog čega kratki peptidi (do 10 aminokiselina) predstavljaju najprikladniju opciju za istraživanje amiloidne agregacije.^{88,101,102} Tablica 1 prikazuje primjere amiloidnih sekvenci koje su zadužene za agregiranje amiloida, a vidljivo je da već tripeptid (peptid od tri aminokiseline) – VYK – dovoljan za nastanak vlakana sličnih strukturno i po organiziranosti kao kod amiloida. Najčešće istraživani peptid iz tablice 1 je amiloid- β peptid fragmenata A β -40 i A β -42. Nekoliko studija opisano je u preglednim člancima Teplowa i Serpella.^{103,104} Hilbich¹⁰⁵ i suradnici pokazali su da je područje LVFF važno za formiranje β -nabranih ploča. Krysman¹¹ i suradnici pokazali su da pentapeptidni slijed KLVFF se može udruživati u vlakna slična amiloidnima. Često upotrebljavani fragment za ispitivanje amiloidne agregacije je heksapeptid Ac-Val-Gln-Ile-Val-Tyr-Lys-NH₂ (AcPHF6, slika 13) koji je pokazao brzo nastajanje amiloidnih fibrila u svega nekoliko sati.¹⁰⁶



Slika 13. Struktura acetil- τ deriviranog heksapeptida za ispitivanje amiloidne agregacije Ac-Val-Gln-Ile-Val-Tyr-Lys-NH₂ (AcPHF6).

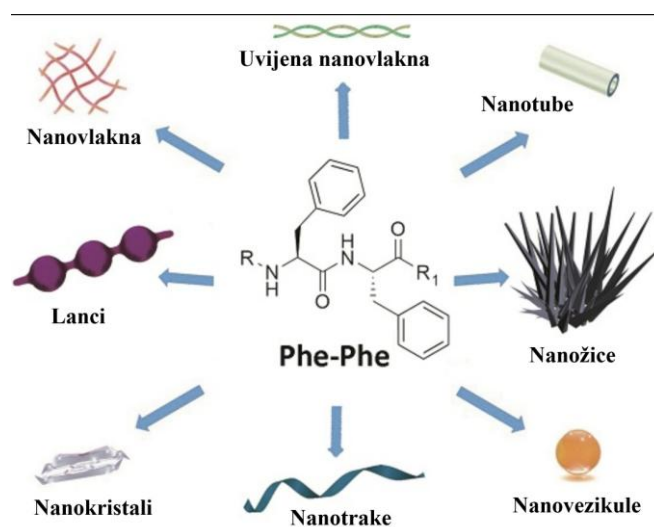
Sve više se istražuju i kraći peptidni lanci od dvije do četiri aminokiseline za ispitivanje stvaranja amiloidnih fibrila. Karakteristično ponašanje slično β -nabranim pločama proizlazi iz aromatskih aminokiselina koje u peptidnim lancima pokazuju veliku sklonost samoudruživanju. Kratki peptidi i njihovo samoudruživanje u vlaknaste amiloidne strukture istražuju se zadnjih 30-ak godina, a najkraća sekvenca do sad utvrđena je dipeptid FF koji potkrjepljuje zaključak da aromatske aminokiseline imaju utjecaj u samoudruživanju.¹⁰⁷

Tablica 1. Pregled kratkih peptidnih fragmenata koji se samoorganiziraju u amiloidna vlakna.⁸⁸

Naziv proteina	Povezana amiloidna bolest	Amiloidna sekvenca
Amilin (<i>eng.</i> Islet Amyloid PolyPeptide, IAPP)	Dijabetes tipa 2	NFGAIL / NFLVH
Ljudski kalcitonin	Karcinom štitnjače	DFNK
Ljudski protein medin	Aortna amiloidoza	NFGSVQ
Amiloid-beta peptid	Alzheimerova bolest	KLVFFA
PHF6 (τ (tau)-protein)	Alzheimerova bolest	VYK
Gelsolin	Finska nasljedna amiloidoza	SFNGDCCFILD
Serum amiloidni protein (SAP)	Kronična inflamatorna amiloidoza	SFFSFLGEAFD
B2-mikroglobulin	Bubrežna amiloidoza	DWSFYLLYTEFT

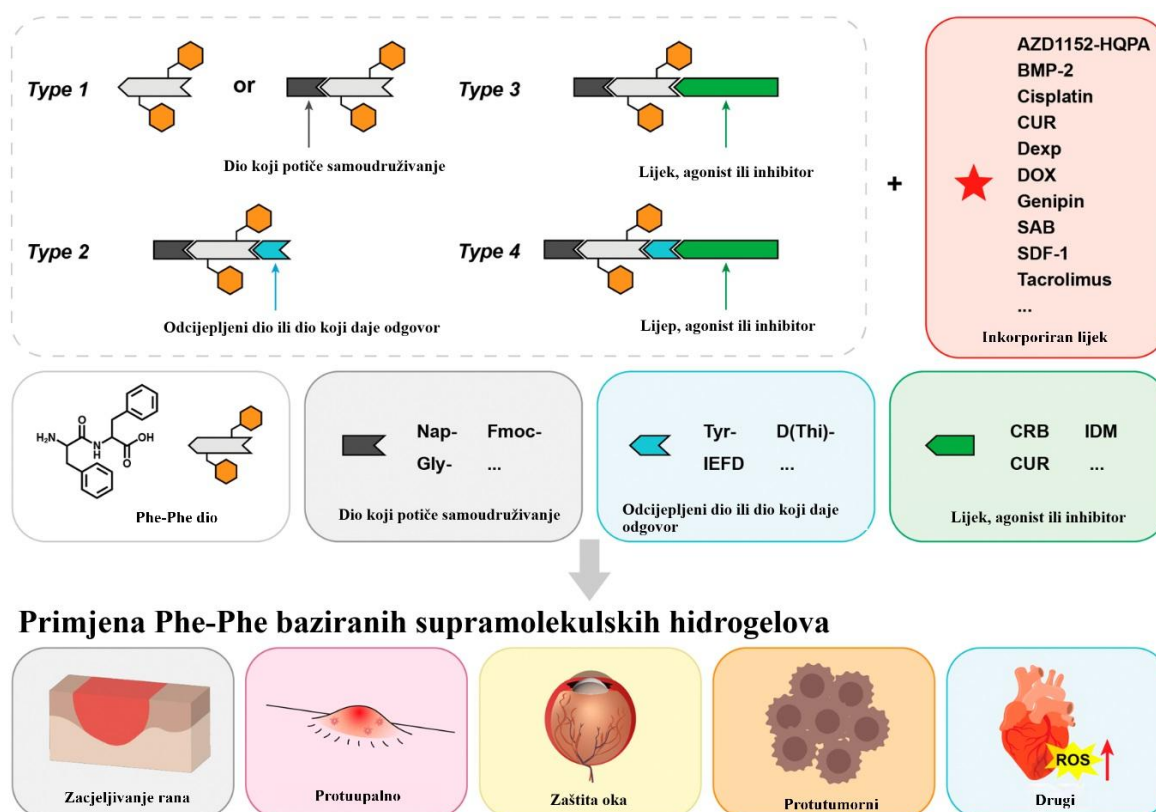
2.4.1. Uloga dipeptida Phe-Phe u samoudruživanju kratkih peptida

Upotreba peptida donosi mnoge prednosti uključujući jednostavnost sinteze te mogućnost modifikacija peptidnog slijeda i njihove biokompatibilnosti i biomimetičke prirode. Difenilalanin (L-Phe-L-Phe, FF) smatra se najmanjom i osnovnom građevnom jedinicom u procesu samoudruživanja peptida uključujući i proces samoudruživanja peptida A β u amiloidna vlakna kod Alzheimerove bolesti. U različitim kontroliranim uvjetima samoudruživanjem mogu se dobiti različite strukture poput nanocijevi, nanovlakana, nanovezikula i dr. (slika 14).¹²



Slika 14. Tipovi nanostrukture Phe-Phe (FF) dipeptida nastalih samoudruživanjem (ilustracija preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru).¹⁰⁷

Reches i Gazit¹⁰⁸ su pokazali da se FF dipeptid kombinacijom vodikovih veza i aromatskih π - π interakcija u vodi samoorganizira u nanocijevi duljine do 100 nm. Intermolekulske interakcije koje uključuju aromatske prstene su ključni proces u kemijskim i biološkim prepoznavanjima.¹⁰⁹ Vezanje vodikovim vezama u više smjerova omogućava formiranje nekovalentnih interakcija i stvaranje mreže koja se dodatno stabilizira π - π interakcijama, a veliku ulogu u samoorganiziranju imaju i hidrofobne interakcije, elektrostatske interakcije i van der Waalsove interakcije.^{109,110} Takve nekovalentne interakcije između peptida međusobno te između peptida i vode omogućuju formiranje stabilne nanovlaknaste strukture. Najviše istraživana skupina su nanovlakna zbog njihove biokompatibilnosti. Povećavanjem nanovlakana makroskopska vlakna se udružuju i time se dobiva makroskopski hidrogel. FF makroskopski hidrogelovi imaju dobru elastičnost, veliku moć imobilizacije lijekova u strukturu, odličnu biokompatibilnost i karakteristike za injektiranje.^{18,111-113} Kao što je prije spomenuto, velika prednost peptida i malih molekula je modifikacija njihove strukture kako bi se dobile nove funkcije i primjena (slika 15). Tome pridonose hidrofilna i hidrofobna svojstva koja omogućuju vezanje s aktivnim molekulama. Neki FF bazirani supramolekulski hidrogelovi pokazuju odgovor na važne markere u specifičnim bolestima pri čemu se razgrađuju kako bi otpustili lijekove.^{114,115}



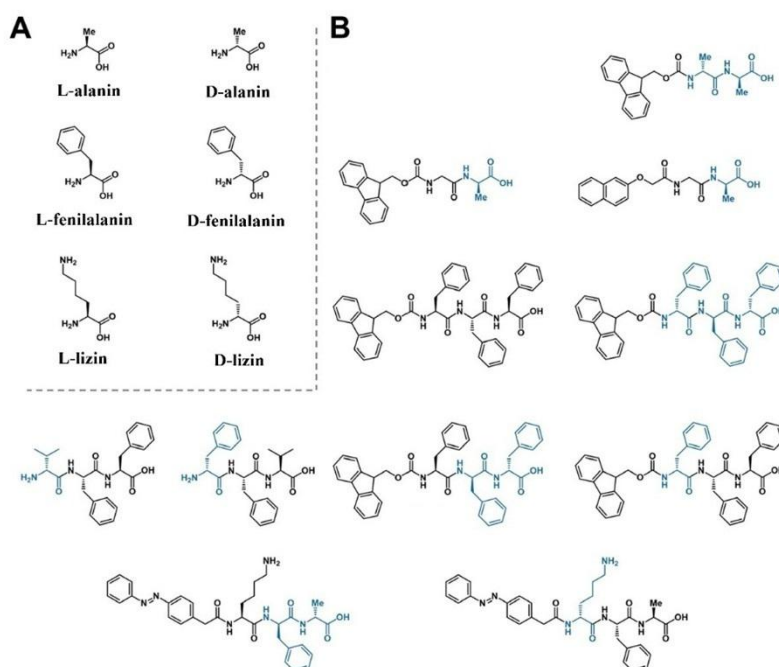
Slika 15. Strategija razvoja hidrogelova temeljenih na FF i njihova biomedicinska primjena (kratice u shemi: BMP-2, koštani morfogenezni protein-2; CUR, kurkumin; Dex, deksametazon natrijev fosfat; DOX, doksorubicin; SAB, salvianolna kiselina B; SDF-1, faktor-1 izveden iz stromalnih stanica; Nap, 2-naftiloctena kiselina; Fmoc, 9-fluorenilmetiloksikarbonil; Gly, glicin; D(Thi), asparaginska kiselina funkcionalizirana tiazolidinomom; IEFD, izoleucin-glutaminska kiselina-fenilalanin-asparaginska kiselina; CRB, klorambucil; IDM, indometacin) (ilustracija preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru).¹²

Fluorenilmetoksikarbonil (Fmoc) zaštićeni F derivati su skupina gelatora koji se spontano samoudružuju u fibrile koji zatim stvaraju hidrogelove u vodi.¹¹⁶ Fmoc ima važnu ulogu u stvaranju gelova zbog aromatskih π - π interakcija između susjednih fluorenil jezgara.¹¹⁷ Gazit i suradnici¹¹⁸ dokazali su da Fmoc-FF hidrogelovi nastaju pri fiziološkom pH što im omogućuje primjenu u dostavi lijekova i tkivnom inženjerstvu. Jayawarna i suradnici^{119,120} prikazali su *in vitro* trodimenzionalnu tkivnu kulturu u hidrogelovima Fmoc-FF i Fmoc-RGD (Fmoc-Arg-Gly-Asp). Sahu i suradnici¹²¹ ispitali su gelatorska svojstva Fmoc-L-(Fmoc)-F hidrogelova koji su pokazali geliranje pri malim koncentracijama te su stabilni i reverzibilni.

2.4.2. Konfiguracije aminokiselina u gelovima

Samoudružujući kratki peptidi su atraktivni minimalni sustavi koji oponašaju sastavnice živih sustava i gradivnih biomaterijala. Kombinacija D- i L-aminokiselina u heterokiralne sekvence je svestrana strategija za izgradnju trajnih supramolekulskih arhitektura, posebice kada se njihovi homokiralni analozi ne samoudružuju. Poznato je da D-aminokiseline imaju ključnu ulogu u kratkim bioaktivnim motivima, kao što je D-Phe u oponašanju fibronektina za uključivanje integrina i D-Ala u demorfinu za vezanje na opioidne receptore.^{122,123} D-aminokiseline također privlače pozornost zbog svoje sve veće uloge u moždanoj neurotransmisiji.¹²⁴ Zbog toga se istražuje korištenje D-aminokiselina u jednostavnim građevnim sustavima za supramolekulske biomaterijale. Kombiniranje L- i D-aminokiselina u kratkim peptidima moglo bi pružiti jedinstveni pristup finom podešavanju njihovog životnog vijeka u biološkim okruženjima (slika 16). U konačnici, razumijevanje učinka D-aminokiselina u samoorganiziranim kratkim peptidima moglo bi unaprijediti terapijska rješenja od amiloidoze¹²⁵ pa sve do dijabetesa¹²⁶. Garcia i suradnici¹²⁴ su istražili geliranje izmjeničnih D- i L-aminokiselina u tripeptidu koji favorizira amfifilnu β -konfiguraciju (u β -pločama je jedna strana hidrofilna, a druga hidrofobna). Peptid Phe-D-Ala-Phe koji je najmanje hidrofoban i sterički ometan nije stvarao hidrogel. Vargiu i suradnici¹²⁷ istraživali su kratke peptide kombiniranih konfiguracija aminokiselina Phe-D-aminokiselina-Phe kod kojih potvrđuju nastanak β -nabrane ploče. Pokazali su da brzo u vodi gelove stvara sekvenca D-Leu-Phe-Phe za razliku od D-Val-Phe-Phe. Značajan primjer prirodno korištene D-aminokiseline je D-Ala-D-Ala, koja je završetak pentapeptidnog bočnog lanca peptidoglikana koji se nalazi u stijenkama stanica Gram pozitivnih bakterija te je meta za inhibiciju mikroba antibioticima poput vankomicina.¹²⁸ Čudesna upotreba D-aminokiselina u prirodi također potiče istraživanje D-aminokiselina za različite primjene. Unatoč tome što je skupa sinteza D-proteina, D-peptid iz takvog procesa pretraživanja, budući da je otporan na proteolitičku degradaciju, predstavlja napredak u manipuliranju D-aminokiselinom za razvoj biostabilnih inhibitora kao potencijalnih terapeutika.¹²⁹ Nekoliko antibiotika također sadrži D-aminokiselinu, poput penicilina G (δ -(L- α -aminoadipil)-L-Cys-D-Val), gramicidina, aktinomicina ili polimiksina. Ne ograničavajući se na prokariote, D-aminokiseline su također izolirane iz eukariotskog tkiva, uključujući dermofin iz žaba, toksine otrova iz pauka ili kljunaša ili neurohormone iz rakova.¹³⁰ Nedavno su ove D-aminokiseline otkrivene u raznim ljudskim tkivima, posebno prisutnost D-aspartata. To je slučaj za elastin¹³¹, β -amiloid¹³², α -sinuklein¹³³ ili AB-kristalin¹³⁴. Zanimljivo

je da su ovi proteini uključeni u nekoliko patologija: arteriosklerozu, Alzheimerovu i Parkinsonovu bolest, što pokazuje važnost kiralnosti u fiziološkim procesima. Istraživanje uloge aminokiselina *in vivo* (kao signalnih molekula u mozgu ili endokrinim žlijezdama, ili u bolestima povezanim sa starenjem) trenutno je fascinantna tema.¹³⁵



Slika 16. A) Molekulske strukture L- i D-aminokiselina, B) primjeri kemijskih struktura peptida s L- i D-aminokiselinama koji formiraju hidrogel.¹³⁵

2.4.3. Sustavi s peptidnim hidrogelovima za dostavu lijekova

Supramolekulski hidrogelovi, koji uključuju male peptidne gelatore, privlače veliku pozornost kao inovativni nosači lijekova za skladištenje i kontrolirano otpuštanje lijekova. Hidrogelovi građeni od peptida, proteina, ugljikohidrata i oligonukleotida su biokompatibilne alternative polimernim hidrogelovima koji pokazuju citotoksičnost prilikom razgradnje *in vivo*.¹³⁶ Velika prednost kratkih peptidnih hidrogelova uključuje jednostavnu sintezu, male troškove, kontrolu molekulske kompozicije, inherentnu biokompatibilnost i biorazgradivost. Prednost je veća kod kratkih peptida koji se sastoje od tri aminokiseline zbog jednostavne pripreme. Kao što je prije spomenuto, sve veću pozornost privlače peptidi građeni od L- i D-aminokiselina zbog specifične konfiguracije peptida, povećane stabilnosti i ponekad iznenađujuće bioaktivnosti. Kontrolirano otpuštanje može se postići smislenim dizajnom peptida koji stvara hidrogelove npr. ako je lijek u kontaktu s mrežom hidrogela, vezanjem lijeka nekovalentnim vezama koje se mogu hidrolizirati.¹³⁷ Najnoviji pristup je sustav suudruživanja (engl. *co-assembly*) u kojem se

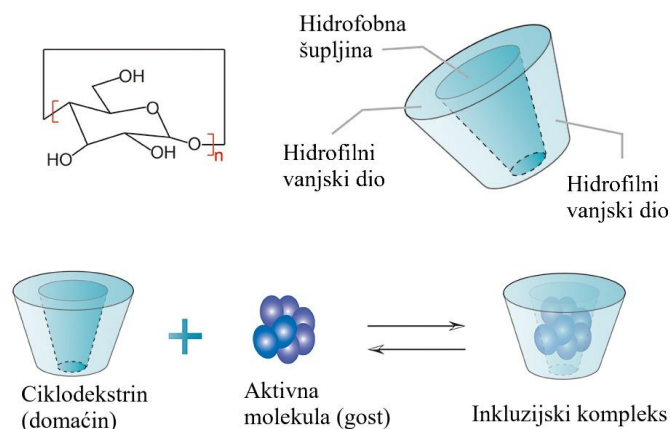
samoudružuju dvije ili više samoudružujućih vrsta, kod kojega se u uređenoj strukturi može, ali ne mora naći komponenta koja se ne sklapa. U tom slučaju otpuštanje je sporije kako se nanostruktura razgrađuje, no kako bi takav sustav postojao moraju se zadovoljiti fizikalno-kemijski uvjeti.¹³⁸ Dizajn takvog sustava još uvijek predstavlja velik izazov zbog nedovoljno objašnjenog ponašanja molekula gelatora u procesu samoudruživanja te do koje mjere mogu pohraniti druge molekule (poput lijekova). Idealni hidrogelovi za *in vivo* dostavu lijekova bi trebali biti tiksotropni što bi omogućilo aplikaciju injektiranjem. Također bi trebali pokazati stabilnost kroz nekoliko dana u tjelesnim tekućinama i tkivima kako bi mogli postepeno otpuštati lijek.¹³⁹ Kurbasic i suradnici¹³⁹ pokazali su da D-Leu-Phe-Phe ima dobar potencijal za sporo otpuštanje lijekova poput naproksena i ketoprofena. Jagrosse i suradnici¹³⁶ ispitivali su otpuštanje biomolekula ribonukleaze A (RNaza A), serum goveđeg albumina (BSA) i imunoglobulina klase G (IgG) iz modificiranog hidrogela fluorenilmetiloksikarbonil modificiranog fenilalanina (Fmoc-F₅-F-DAP). Koutsopoulos i suradnici¹⁴⁰ također istražuju otpuštanje biomolekula iz Ac-(RADA)₄-NH₂ hidrogela. Inkorporiranje lipidnih nosača poput liposoma u hidrogel omogućuje kontrolirano otpuštanje lijeka ili antigena pri čemu se povećava njihova bioraspodjeljivost u takvim sustavima.^{21,25-29} Novije studije ističu potencijal peptidnih nanomaterijala kao obećavajućih sustava za cjepiva, pripisujući to njihovim snažnim adjuvantskim, imunostimulacijskim aktivnostima i sposobnosti aktiviranja proizvodnje protutijela.³⁰ Kemijska struktura igra veliku ulogu u imunostimulacijskoj aktivnosti peptidnih hidrogelova.³⁰ Male promjene u kemijskoj strukturi i redoslijedu aminokiselina u peptidu mogu značajno utjecati na aktivnost hidrogel.¹⁴¹ Studije su pokazale da manje promjene u sekvencama aminokiselina, poput izmjene hidrofobnih skupina ili promjene naboja funkcijskih skupina, može značajno utjecati na imunostimulaciju.¹⁴¹ Supramolekulski gelovi poput D-tetrapeptida Nap-D-Gly-D-Phe-D-Phe-D-Tyr (Nap = 2-naftalen octena kiselina, Nap-G^DF^DF^DY) su pokazali značajnu imunostimulacijsku aktivnost. U takvim sustavima zamjena ili promjena redoslijeda aminokiselina značajno umanjuje količinu nastalih protutijela u imuniziranim miševima.¹⁴¹ Peptidi koji sadrže protonirane aminokiseline pokazuju jaču imunostimulirajuću aktivnost od negativno nabijenih, deprotoniranih karboksilnih skupina.^{31,32}

2.5. *Domaćin-gost sustavi*

Supramolekulska kemija svoje začetke pripisuje istraživanju domaćin-gost sustava koje je uvelike zahvaćalo istraživanja krunskih etera. Krunski eteri imaju strukturu u koju se može smjestiti mala molekula ili ion ostvarujući tako nekovalentne interakcije. Ponašanje krunskih etera povezano je s principom vezanja metalnih iona u šupljinu ionofora zaduženih za transport u staničnim membranama ili vezanja supstrata na aktivno mjesto u enzimima. Daljnja istraživanja krunskih etera dovela su do sinteze novih spojeva – kriptanda¹⁴², kukurbiturila¹⁴³, kaliksarena¹⁴⁴, ciklodekstrina¹⁴⁵ i drugih. Svi navedeni spojevi imaju zajedničko svojstvo da vežu neutralne molekule ili ione u svoju strukturu. Vještīm korištenjem znanja iz supramolekulske kemije i poznavanjem sustava moguće je u šupljinama navedenih molekula, koja se također nazivaju i vezna mjesta, zarobiti specifično samo jednu vrstu molekule. Makrociklički spojevi s manjim utorom vezanja teže stehiometrijskom omjeru 1:1, dok oni s većim utorima tvore komplekse viših stehiometrija.³⁵ Istraživanja makrocikličkih spojeva, posebice krunskih etera¹⁴⁶⁻¹⁴⁹, bila su početni interes istraživanja na Institutu Ruđer Bošković u sklopu Laboratorija za supramolekulsku kemiju koja su se proširila i na druge sustave.

2.6. **Ciklodekstrini**

Posljednjih godina supramolekulska kemija je postala veoma utjecajna u području makrociklične kemije. Iako je slaba topljivost veliki problem velikom broju lijekova, vezanje u komplekse domaćin-gost može omogućiti bolju topljivost u vodi. Jedno od svojstva ciklodekstrina (CD) je njihova mogućnost modifikacije fizikalno-kemijskih i bioloških karakteristika lijekova. Ciklodekstrini (alfa-ciklodekstrin (α -CD), beta-ciklodekstrin (β -CD), gama-ciklodekstrin (γ -CD), hidroksipropil-beta-ciklodekstrin (HP- β -CD) su se pokazali kao dobri domaćini koji pospješuju topljivost lijekova slabo topivih u vodi stvarajući inkluzijske komplekse (slika 17, tablica 2).³³



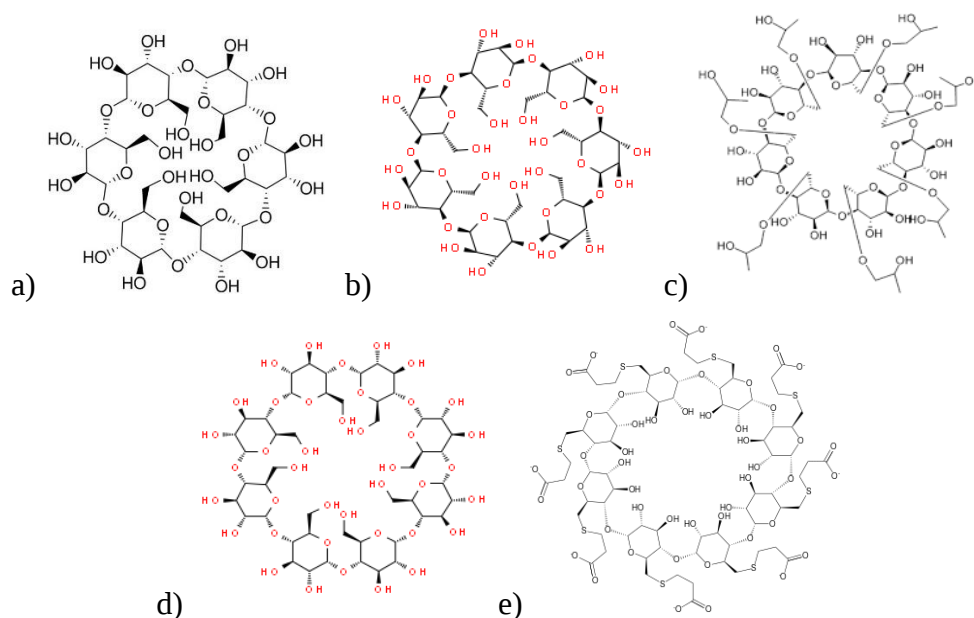
Slika 17. Inkluzijski kompleks ciklodekstrina i aktivne molekule.

Tablica 2. Topljivost (g/100 mL) prirodnih ciklodekstrina (α -CD, β -CD, γ -CD, HP- β -CD).^{150,151}

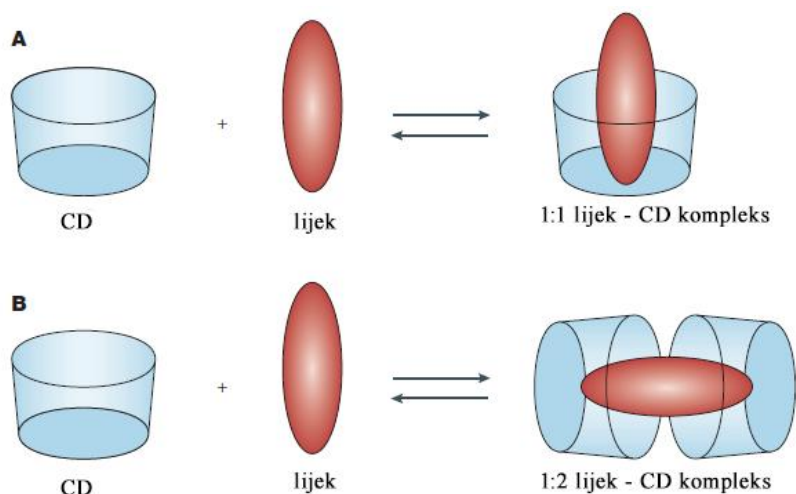
Otapalo	α -CD	β -CD	γ -CD	HP- β -CD
Voda (25 °C)	14,5	1,85	23,2	45
Dietil-eter	Netopljiv	Netopljiv	Netopljiv	/
Kloroform	Netopljiv	Netopljiv	Netopljiv	/
Izopropanol	Netopljiv	Netopljiv	< 0,1	/
Aceton	Netopljiv	Netopljiv	< 0,1	/
Etanol	Netopljiv	Netopljiv	< 0,1	30
Metanol	Netopljiv	Netopljiv	< 0,1	/
Glicerin	Netopljiv	4,3	/	/
Propilen-glikol	1	2	/	/
Dimetilsulfoksid	2	35	/	30
Etilen-glikol	9	21	/	/
Dimetilformamid	54	32	/	30

Najčešći prirodni CD su α -ciklodekstrin (α -CD), β -ciklodekstrin (β -CD) i γ -ciklodekstrin (γ -CD) (slika 18a,b,d) koji se sastoje od šest, sedam i osam D-glukozičnih jedinica vezanih 1,4-glikozidnim vezama i imaju jedinstvenu strukturu nalik na šuplji krnji stožac. Vanjski dio stošca sadrži hidrofilne skupine, dok je unutrašnji dio hidrofoban (slika 17). Takvo svojstvo omogućuje vezanje lipofilnih molekula u šupljinu. Vezanje molekule, iona ili radikala kao gosta u šupljinu provodi se intermolekulskim silama.³³ Tijekom nastajanja kompleksa ne nastaju i ne prekidaju se kovalentne veze, a molekule lijeka unutar kompleksa su u ravnoteži sa slobodnim

molekulama u otopini. Ukoliko je molekula lijeka kompatibilna s molekulom ciklodekstrina i manje polarna od vode, u većini slučajeva nastaju kompleksi ciklodekstrina i lijeka u omjeru 1:1, no zabilježeno je i nastajanje kompleksa i u drugim omjerima (slika 19).^{152,153}

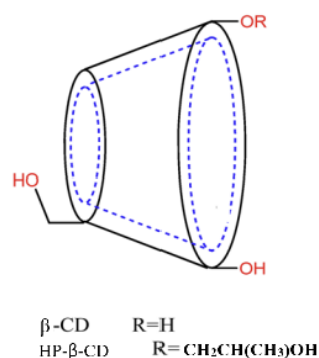


Slika 18. Ciklodekstrini: a) α -ciklodekstrin b) β -ciklodekstrin, c) (2-hidroksipropil)- β -ciklodekstrin, d) γ -ciklodekstrin, e) Sugamadeks.



Slika 19. Shematski prikaz formiranja inkluzijskog kompleksa molekule lijeka i ciklodekstrina u omjeru 1 : 1 (A) i omjeru 1 : 2 (B) (ilustracija preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru).¹⁴⁵

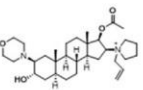
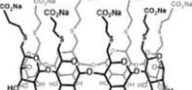
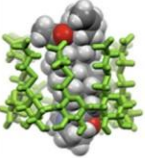
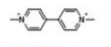
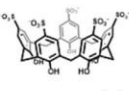
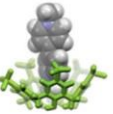
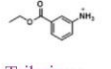
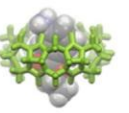
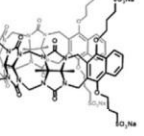
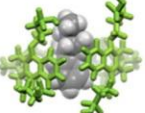
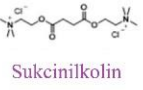
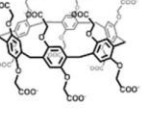
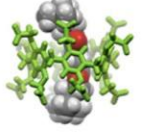
β -CD je od prirodnih ciklodekstrina najjeftiniji i netoksičan pa je time pogodan za oralnu primjenu. Osim prirodnih ciklodekstrina postoje i razni derivati. Derivati ciklodekstrina pokazali su bolju topljivost u kompleksima, ali su skuplji i djelomično toksični zbog čega je njihova upotreba ograničena. Hidroksialkilni derivati β -CD poput 2-hidroksietil- β -CD (2-HE- β CD), 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina (2-HP- β -CD, slika 18c) i 3-hidroksipropil- β -CD (3-HP- β -CD) su jedni od najčešće upotrebljivanih derivata za kompleksiranje lijekova (slika 20).¹⁵¹



Slika 20. Strukturni prikaz β -ciklodekstrina (β -CD) i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina (HP- β -CD) (ilustracija preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru).¹⁵⁴

Derivat γ -CD Sugamadeks (engl. *Sugammadex*, SMX, slika 18e), poznat pod medicinskim nazivom Bridion, specifično je dizajniran za selektivno vezanje u inkluzijski kompleks s velikim afinitetom za neuromuskulatorne blokirajuće agense (NMBA) rokuronij i vekuronij (slika 21) u stehiometrijskom omjeru 1:1. Veliki afinitet SMX-a za vezanje NMBA omogućuje brzo smanjenje koncentracije slobodnih NMBA u plazmi. Smanjenje koncentracije NMBA u plazmi stvara koncentracijski gradijent između NMBA u plazmi i živčano-mišićnoj spojnici, što potiče prijelaz slobodnih NMBA iz sinapse u plazmu te time sprječava neuromuskulatornu blokadu. Veliki afinitet molekule domaćina prema drugoj molekuli stvara mogućnost kompetitivnog vezanja, odnosno primarnog vezanja nove molekule, a time bi se kod SMX mogla zamijeniti nova molekula s vezanim rokuronijem i vekuronijem.¹⁵⁵ Farmakokinetika HP- β -CD, SBE- β -CD i SMX proučavana je na ljudima pri parenteralnoj primjeni te se pokazalo kako se ciklodekstrini većinom (> 90 %) izlučuju nepromijenjeni u urinu glomerularnom filtracijom dok se ostatak uklanja putem metabolizma jetre i izlučivanja bilijara. Vrijeme poluraspada faze eliminacije u vrijednostima je između 1,6 i 1,9 h.¹⁵⁶ Farmakokinetička

ispitivanja pokazala su kako će se preko 90 % parenteralno primijenjenog ciklodekstrina eliminirati iz tijela u roku od 6 sati, a preko 99,9 % u roku od 24 sata stoga kod osoba s normalnim radom bubrega neće doći do nakupljanja ciklodekstrina.¹⁵⁷ Zbog vrlo niske bioraspoloživosti, α -, β - i γ -ciklodekstrin i njihovi hidrofilni derivati praktički su netoksični ako se daju oralno.¹⁴⁵ Primjena ciklodekstrina za kompleksiranje lijekova u svrhu poboljšanja topljivosti istražuje se svakodnevno. Osim toga, primjena lijekova u medicini koji mogu izazvati neželjene nuspojave (mučnina, besvjestica, vrtoglavica) u prekomjernim dozama potaknula je znanstvena istraživanja supramolekulskih sustava sposobnih za kompleksiranje lijekova čime bi se poništili štetni efekti. Veliki broj lijekova su male molekule koje se mogu vezati u šupljine makrocikla ili domaćina i time stvarati inkluzijske komplekse (slika 21).³⁶

Godina	(+) Željeni efekt (primjena)	(-) Neželjeni efekt (toksičnost)	Supramolekulski protuotrov	Inkapsuliran otrov	Prednosti
2002	 Rokuronij Opuštanje mišića (anestezija)	Trajanje dulje od potrebnog (kardio- i neurotoksičnost)			Ubrzan oporavak
2009	 Parakvat Generiranje ROS (pesticid)	Trovanje (jetra, pluća, bubrezi)			Povećan postotak preživljavanja
2015	 Trikain Opuštanje mišića (anestezija)	Trajanje dulje od potrebnog (kardio- i neurotoksičnost)			Ubrzan oporavak
2017	 Metamfetamin Stimulant i afrodizijak (rekreacija)	Hiperaktivnost i psihozoza (kardio- i neurotoksičnost)			Smanjuje hiperaktivnost
2019	 Sukcinitilolin Opuštanje mišića (anestezija)	Različite nuspojave (neurotoksičnost, srčana aritmija i dr.)			Smanjuje neželjene efekte

Slika 21. Primjeri malih molekula koje se vežu u makrocikličke spojeve (ilustracija preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru).³⁶

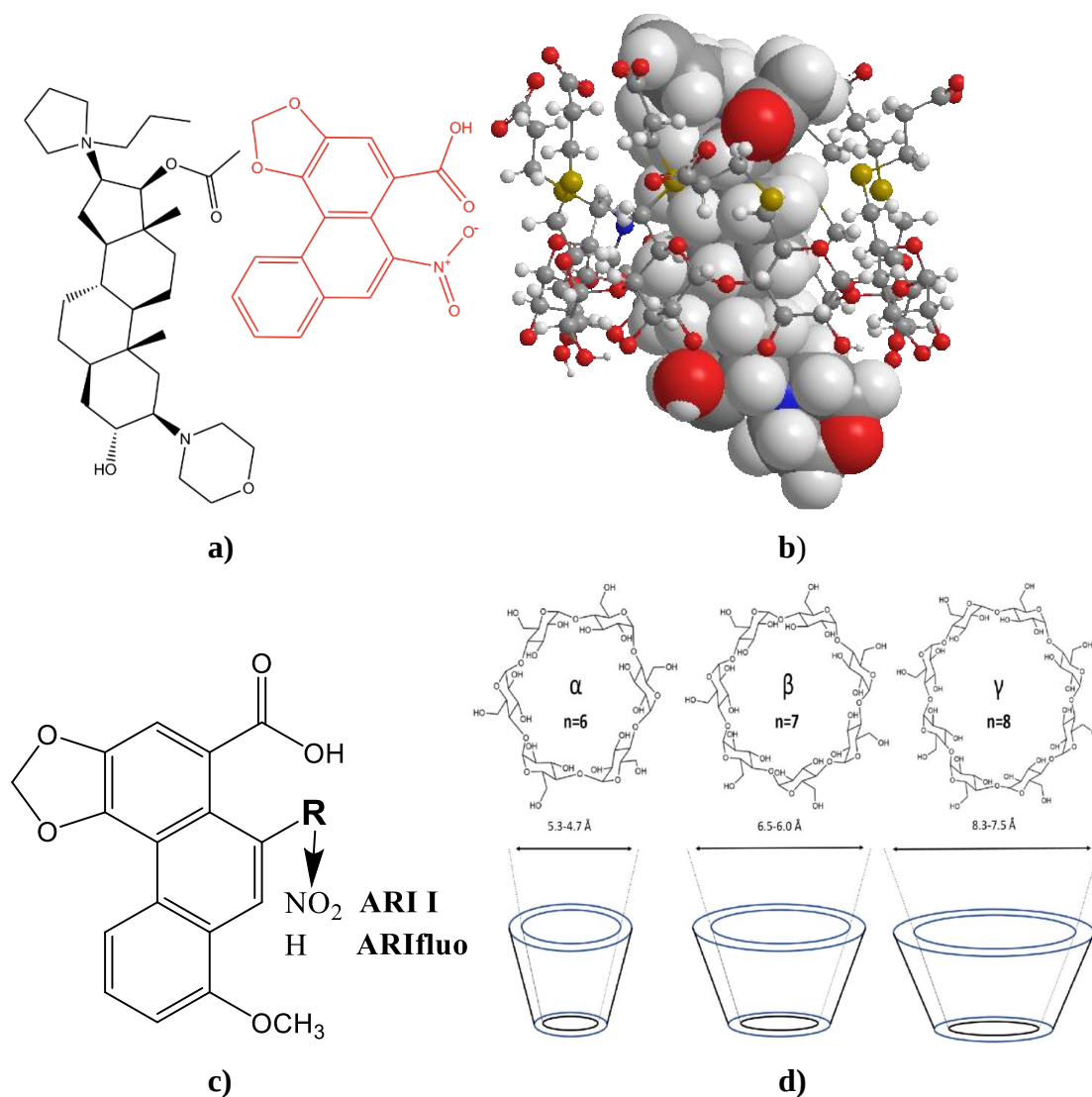
Supramolekulski antidot se odnosi na makrocikle ili domaćine koji mogu *in vivo* zarobiti toksičnu molekulu i time poništiti njeno djelovanje. SMX je pokazao da efektivno veže NMBA i time pospješuje oporavak nakon anestezije.³⁶ Uspješna primjena SMX potaknula je

znanstvenike na razvoj novih supramolekulskih antidota i ispitivanje novih sustava za detoksifikaciju za potencijalnu kliničku primjenu.

2.7. Inkluzijski kompleksi ciklodekstrina s malim molekulama i biomolekulama

U ovoj disertaciji istražiti će se ciklodekstrini kao antidot za brzo uklanjanje toksina aristolohijske kiseline. Skupina biljnih toksina aristolohijske kiseline (aristolohijska kiselina I, ARI) (slika 22c) su planarne aromatske molekule poznate po svojem kancerogenom, mutagenom i nefrotoksičnom djelovanju i povezana je s Europskom Balkanskom regijom (posebice područjem Dunav-Crno more) koja je uzrokovala ozbiljnu endemsku nefropatiju.¹⁵⁸ Biljni pripravci koji sadrže aristolohijsku kiselinu korišteni su u porodništvu, terapiji artritisa, gihta, reumatizma, gnojnih rana i režimu mršavljenja^{159,160}, a protuupalna svojstva također su proučavana sve dok nije uočeno da aristolohijska kiselina ima jako kancerogeno djelovanje i uzrokuje nefropatiju¹⁶¹, što je dovelo do prekida korištenja botaničkih proizvoda koji sadrže aristolohijsku kiselinu.^{159,162} Aristolohijska kiselina najčešće dospije u ljudski organizam putem hrane i vode.¹⁶³ Niska topljivost aristolohijske kiseline u vodi obično dovodi do posljedičnog hidrofobnog vezanja na serumski albumin u krvi, te se na taj način prenosi cijelim tijelom, snažno potpomognut hidrofobnošću aristolohijske kiseline i posljedično sporom kinetikom izlučivanja iz organizma.¹⁶⁴ Aristolohična kiselina sama po sebi ima nisku toksičnost, no njezinom bioaktivacijom enzimima¹⁶⁵ nastaju kovalentna oštećenja dvolančane DNA, što predstavlja glavni mehanizam njezine toksičnosti.^{166,167} Studije u jugoistočnoj Europi, kao i u Americi i Kini, opisuju kronično trovanje aristolohijskom kiselinom kao snažnom nefrotoksičnom i kancerogenom tvari s iznimno kratkim razdobljem latencije, ne samo u životinja, već i u ljudi. Najveći izazov je, koliko je poznato, pronaći medicinski protokol za liječenje akutno otrovanih ljudi, koji do sad nije poznat. Poznato je da male molekule lijekova poput rokuronija i vekuronija vrlo učinkovito veže analog γ -ciklodekstrina: Sugamadeks (slika 22b).¹⁵⁵ Nadalje, kristalna struktura inkluzijskog kompleksa rokuronij/Sugamadeks pokazala je izvrsno uklapanje male molekule unutar proširene strukture ciklodekstrina¹⁶⁸, a strukturno preklapanje rokuronija s ARI (slika 22a) dokazuje njihovu strukturnu sličnost. Naime, iako je ARI kondenzirana aromatska molekula, dok je rokuronij fleksibilnija policikličko-alifatska molekula, obje zauzimaju sličan van der Waalsov prostor i imaju sličnu hidrofobnost – oba svojstva bitna za formiranje inkluzijskog kompleksa ciklodekstrina. Nekoliko studija opisuju sustave u kojima je korištena interakcija α - ili β -ciklodekstrina (CD) s ARI-jem, uglavnom u

procesu razvoja novih kromatografskih metoda detekcije.^{169,170} Međutim, nema znanstvenih radova koji detaljno opisuju stabilnost kompleksa ARI/CD ili proučavaju utjecaj veličine CD- a α -, β -, γ -ciklodekstrina (slika 22d) na ARI kompleksiranje. Koliko je poznato, nema izvješća o interakcijama Sugamadeks i ARI.



Slika 22. (a) Strukturna sličnost aristolohijske kiseline (ARI, crveno) i neuromuskularno blokirajućeg agensa (Rokuronija, crno), (b) Rokuronij u kompleksu s modificiranim γ -ciklodekstrin - Sugammadex (SMX)¹⁷¹, (c) ARI i ARIfluo¹⁷² strukture, (d) Shematski prikaz α -, β -, γ - veličina ciklodekstrina.

Obzirom da nema poznatog načina liječenja akutne toksičnosti ARI u ovoj disertaciji istražili smo model supramolekulskog sustava s ciklodekstrinima za vezanje, odnosno, brzu detoksifikaciju. Istraživanje se temelji na ARI te fluorescentnom derivatu ARIflo¹⁷⁰ radi proširenja metoda praćenja vezanja gost molekule u ciklodekstrine. Kao što je prije spomenuto, ciklodekstrini se razlikuju po broju šećera, a time i veličini – posebno važna veličina vezne šupljine, zbog čega je naglasak na α -, β -, γ - ciklodekstrinima, kao i modificiranom γ -ciklodekstrinu Sugammadexu (SMX) koji su komercijalno dostupni i često korišteni u ispitivanjima vezanja s ciklodekstrinima. Obzirom da je toksičnost posljedica vezanja ARI na goveđi serum albumina (engl. *bovine serum albumin*, BSA), te je tako distribuiran u organizmu velika pažnja usmjerena je na kompetitivno vezanje na biomolekule BSA i ds-DNA.¹⁶⁵⁻¹⁶⁷

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Uvod

Tankoslojna kromatografija rađena je na pločicama silikagela Merck 60 F₂₅₄, a vizualizacija je omogućena upotrebom UV lampe (254 nm) ili parama joda. Otapala su pročišćena metodama opisanim u literaturi te su pohranjena na molekulskim sitima. Točke tališta određene su na Koflerovom mikroskopu i nisu korigirane. ¹H NMR i ¹³C NMR spektri snimljeni su na Bruker AV600 (magnet 14 T) i AV300 (magnet 7 T) spektrometrima. Dvodimenzijski COSY (engl. *Correlation Spectroscopy*) te NOESY (engl. *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*) spektri snimljeni su uz upotrebu standardnog programskog paketa Bruker. Kemijski pomaci (δ) izraženi su u ppm u odnosu na DMSO-*d*₆ ili na TMS kao unutrašnji standard, a konstante sprege (*J*) u hercima (Hz). Optička rotacija mjerena je na polarimetru AA-10 pri valnoj duljini od 589,3 nm. Morfologija gelskih niti određena je transmisivskim elektronskim mikroskopom (TEM, Zeiss EM 10A, napon ubrzanja 60 kV i HRTEM JEOL 2100, napon ubrzanja 200 kV) i mikroskopom atomskih sila (AFM, Bruker), a proba se sastojala od poluge sa šiljkom (SiN₃, SiO₂, C-nanocijev). Uzorci gela za potrebe snimanja TEM mikroskopijom kontrastirani su s 2 % vodenom otopinom kalijeve soli fosfovolframske kiseline (H₃PW₁₂O₄₀, pWk) ili su sijenčani paladijem odnosno platinom. Uzorci hidrogela obojanog fluorescentnim komponentama promatrani su i snimljeni pomoću konfokalnog mikroskopa Leica SP8 X FLIM (objektiv: NA 1.4, uljna imerzija; 60x) pomoću fluorescencije i u reflektiranom svjetlu. U ovoj tehnici, uzorak se osvjetljava točku po točku, a emitirana ili reflektirana svjetlost se detektira i tvori sliku u memoriji digitalnog računala. Glavna prednost konfokalne fluorescencijske mikroskopije, u usporedbi s klasičnom svjetlosnom mikroskopijom, je mogućnost optičkog seciranja, tj. dobivanja oštre slike tankog sloja pri snimanju debelog uzorka. FTIR-ATR spektri mjereni su na INVENIO-S Bruker spektrometru s BioATR II jedinicom, opremljen s fotonaponskim LN-MCT detektorom. KBr razdjelnik snopa je postavljen na aparaturu na 1 mm, a detektor je radio sa brzinom skenera od 15 kHz za visoko osjetljiva mjerenja. ATR jedinica je pročišćena N₂ plinom. BioATR II jedinica je cirkularna s promjerom od 2 mm, baziranom na dvojnoj kristalnoj tehnologiji (engl. *dual crystal technology*, DCT). Gornji ATR kristal je od silicija dok je donji od cinkovog selenida (ZnSe), ali ne dolazi u doticaj s uzorkom. UV/Vis spektri snimljeni su na spektrofotometru Varian Cary 100 Bio. Fluorescencijski spektri snimljeni su na

spektrofotometrima Varian Cary Eclipse i Agilent Technologies CaryEclipse Fluorescence. Spektri cirkularnog dikroizma (CD) snimljeni su pomoću spektrometra JASCO J815 pri 25 °C koristeći kvarcne kivete ($l = 1$ cm). Titracijski podaci su obrađeni u Origin 7.0 programu, korigirani na razrjeđenje. Konstanta stabilnosti određena je iz spektrofotometrijskih podataka pomoću programa HYPERQUAD.¹⁷³ Izotermalna titracijska kalorimetrijska (ITC) snimanja provedena su na MicroCal™ VP-ITC (MicroCal, Inc., Northampton, MA, USA).

Korišteni spojevi za pripravu liposoma, karakterizaciju te ispitivanja s miševima s nanokompozitima gela i liposoma su: Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH₂ gelator (Ac-FFA-NH₂), Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-OH (Ac-FFA-OH) te Ac-L-Phe-L-Phe-β-Ala-OMe (Ac-FFβA-OMe), koji su prethodno sintetizirani u Laboratoriju za supramolekulsku kemiju prema opisanom postupku sinteze.^{174,175} Kolesterol (iz svinjske jetre, Sigma (SAD)), L-α-fosfatidilkolin, tip XI-E (iz žumanjka jajeta), dipalmitoilfosfatidilkolin (DPPC, Avanti Polar Lipids, USA), dimiristoilfosfatidilkolin (DMPC, Avanti Polar Lipids, SAD), goveđi serum albumina (engl. *bovine serum albumin*, BSA, Sigma Aldrich (Njemačka)), Ovalbumin (OVA, Serva (Germany)), Tween 20, mišje monoklonsko anti-OVA protutijelo (klon OVA-14 mišji IgG1 izotip) i o-fenilendiamin dihidroklorid (Sigma (SAD)). Kozja protutijela klase IgG konjugirana s peroksidazom iz hrena specifična za cijelu molekulu mišjeg IgG (HRP-anti-mišji IgG) (Bio-Rad Laboratorij (SAD)), Biotin-konjugirani štakorska anti-mišja IgG1 i anti-mišja IgG2a monoklonska protutijela i streptavidin-peroksidaza (PharMingen, Bekton Dickinson (SAD)). Ostale kemikalije su nabavljene od Kemike (Hrvatska). Kemikalije korištene za praćenje otpuštanja biomolekula iz hidrogela su: doksorubicin (DOX), Myocet (liposomska formulacija DOX), PLGA-Dox (DOX inkapsuliran u nanočestice polilaktilglikolne kiseline).

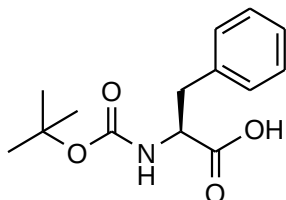
Korištene kemikalije za vezanje malih molekula i biomolekula u ciklodekstrine su: 8-metoksi-6-nitronafto-[2,1-g][1,3]benzodioksol-5-karboksilna kiselina (Aristolohijska kiselina I (ARI, M.W. = 341,27, čistoća ≥ 90 %, Sigma-Aldrich)), dimetil sulfoksid (DMSO, p.a.), goveđi serum albumina (engl. *bovine serum albumin*, BSA, (M.W. = 66,5 kDa, čistoća ≥ 96 %)), DNA iz telećeg timusa (engl. *calf thymus*-DNA, ct-DNA) i puferi su od Sigma-Aldrich. Ciklodekstrini (CD) su: α-CD (M.W. = 972,90, čistoća ≥ 98 %; Sigma- Aldrich), β-CD (M.W. = 1134,37, čistoća ≥ 97 %; Thermo Fischer), γ-CD (M.W. = 1297,12, čistoća ≥ 98 %; Sigma-Aldrich) i Sugamadeks (engl. *Sugammadex*, (SMX) (Bridion®, CYC-Br; $c = 0,077$ mol dm⁻³, Merck Sharp & Dohme Limited). Vekuronij (engl. *Vecuronium*, (M.W. = 637,73, čistoća

$\geq 99\%$, Selleck Chemicals)). Deionizirana voda dobivena je Millipore Milli-Q Gradient A10 pročišćivačem vode (Merck Millipore). Ostale kemikalije su nabavljene od Kemike.

3.2. Sinteza tripeptidnih derivata

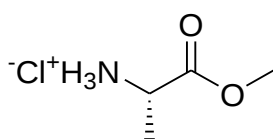
3.2.1. Priprava derivata s aminokiselinskom sekvencom L-Phe-L-Phe-L-Ala

3.2.1.1. (*tert*-butoksikarbonil)-L-fenilalanin); Boc-L-Phe-OH (1)



L-fenilalanin (1,006 g, 6,09 mmol) otopljen je u smjesi *t*-BuOH (4,6 mL) i 1 M NaOH (6,7 mL), ohlađen na 0 °C te se dokapava di-*tert*-butil bikarbonat (1,37 g, 6,09 mmol, 97 %). Reakcija se miješa 15 min na 0 °C nakon čega se nastavi miješati na sobnoj temperaturi 16 h. Otapalo se djelomično upari na rotacionom uparivaču nakon čega se vodeni ostatak ispire etil-acetatom (20 mL). Vodena otopina se zakiseli do pH 1 zasićenom otopinom KHSO₄ te se ekstrahira etil-acetatom (3 x 40 mL). Spojeni organski slojevi se isperu s vodom (25 mL) te suše Na₂SO₄. Otapalo se upari te se dobije željeni produkt Boc-L-Phe-OH (1) kao bijeli prah (1,17 g, 72 %): $R_f = 0,85$ (CH₂Cl₂/CH₃OH 3:1); ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ /ppm: 12,58 (brs, 1H, COOH), 7,30–7,22 (m, 4H, Ph), 7,20 (t, $J = 7,1$ Hz, 1H, Ph), 7,08 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H, NH), 4,12–4,06 (m, 1H, CH), 3,01 (dd, $J = 13,8, 4,5$ Hz, 1H, Ha-CH₂), 2,82 (dd, $J = 13,7, 10,4$ Hz, 1H, Hb-CH₂), 1,31 (s, 9H, Me₃C-O-). Podaci karakterizacije odgovaraju literaturnom.¹⁷⁶

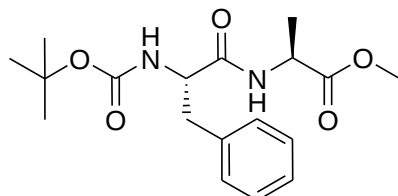
3.2.1.2. L-alanin metilester hidroklorid; L-Ala-OMe × HCl (2)



L-alanin (1,336 g, 15 mmol) se otopi u dvogrloj tikvici u 30 mL apsolutnog metanola te se ohladi na 0 °C. U hladnu otopinu dokapava se tionil klorid (3 mL, 40,8 mmol). Reakcija se miješa na refluksu 4 h nakon čega se nastavi miješati preko noći na sobnoj temperaturi. Reakcija se zatim zagrije na 40 °C te se miješa 1 h. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu otapalo se upari na rotacionom uparivaču te se doda 10 mL MeOH. Postupnim dodavanjem bezvodnog etera iz smjese iskristalizira hidroklorid kao fini kristalni prah. Otapalo se odsiše Büchner lijevkom, a talog se ispere s bezvodnim eterom i suši u eksikatoru. Produkt L-Ala-OMe × HCl (2) (1,61 g, 77 %) je bijeli prah; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ /ppm 8,67 (s, 3H, NH₃⁺),

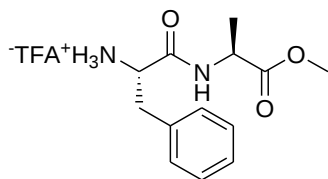
4,11–3,99 (m, 1H, C^{*}H_{Ala}), 3,74 (s, 1H, OCH₃), 1,43 (d, $J = 7,2$ Hz, 3H, CH_{3Ala}). Podaci karakterizacije odgovaraju literaturnom.¹⁷⁷

3.2.1.3. Metil(*tert*-butoksikarbonil)-*L*-fenilalanil-*L*-alaninat; Boc-*L*-Phe-*L*-Ala-OMe (**3**)



Spojevi **1** (2,65 g, 10 mmol) i **2** (1,39 g, 10 mmol) otope se u suhom CH₂Cl₂ (20 mL) i doda se DIPEA (1,74 ml, 10 mmol). Reakcijska smjesa se ohladi na 0 °C nakon čega se doda DCC (2,06 g, 10 mmol) i katalitička količina DMAP (1–2% količine reaktanata). Reakcija se miješa na 0 °C 30 min nakon čega se nastavi miješati na sobnoj temperaturi preko noći. Reakcija se zatim profiltrira nekoliko puta Büchner lijevkom pri čemu se dobije proziran filtrat žućkaste boje. Filtrat se ispiri vodom, 10 % NaHCO₃, 10 % KHSO₄, vodom te suši Na₂SO₄. Otapalo se upari na rotacionom uparivaču te se produkt iskristalizira dodatkom petroletera. Dobiven je produkt Boc-*L*-Phe-*L*-Ala-OMe (**3**) kao bijeli prah (2,69 g, 77 %): $R_f = 0,6$ (Petroleter/EtOAc 7:4); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 7,35 – 7,17 (m, 5H, Ph), 6,40 (d, $J = 6,8$ Hz, 1H, NHC^{*}H), 4,98 (bs, 1H, NHC^{*}H), 4,59 – 4,47 (m, 1H, C^{*}H_{Phe}), 4,36 (d, $J = 2,8$ Hz, 1H, C^{*}H_{Ala}), 3,71 (s, 1H, OCH₃), 3,15–3,00 (m, 2H, CH₂Phe), 1,41 (s, 9H, Me₃C-O-), 1,35 (d, $J = 7,1$ Hz, 3H, CH_{3Ala}). Podaci karakterizacije odgovaraju literaturnom.²²

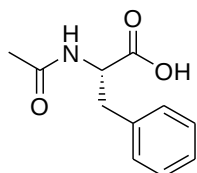
3.2.1.4. *N*-(trifluoroacetil)-*L*-fenilalanin-*L*-alaninat; NH₃⁺TFA⁻-*L*-Phe-*L*-Ala-OMe (**4**)



Spoj **3** (1,716 g, 4,89 mmol) otopi se u suhom CH₂Cl₂ pri 0 °C i doda se 5 mL TFA. Reakcijska smjesa se miješa preko noći na sobnoj temperaturi. Otapalo se upari na rotacionom uparivaču nakon čega se doda toluen kako bi se uklonio višak TFA. Uparavanjem toluena dobije se uljasti produkt NH₃⁺TFA⁻-*L*-Phe-*L*-Ala-OMe (**4**) (1,6 g, 90 %): $R_f = 0,5$ (CH₂Cl₂/CH₃OH 10:1); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ /ppm: 7,71 (d, $J = 6,9$ Hz, 1H, NH^{*}CH), 7,31 – 7,11 (m, 5H, Ph), 4,53 (p, $J = 7,3$ Hz, 1H, C^{*}H_{Ala}), 3,70 (s, 1H, OCH₃), 3,57 (dd, $J = 9,3, 4,0$ Hz, 1H, C^{*}H_{Phe}),

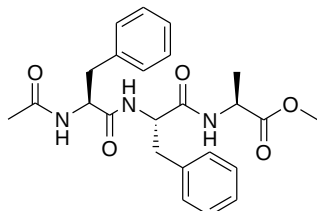
3,18 (dd, $J = 13,7, 3,9$ Hz, 1H, Ha-CH₂Phe), 2,65 (dd, $J = 13,7, 9,3$ Hz, 1H, Hb-CH₂Phe), 1,32 (d, $J = 7,2$ Hz, 3H, CH₃Ala).

3.2.1.5. *N*-acetil-*L*-fenilalanin; *Ac-L-PheOH* (5)



L-PheOH (1,65 g, 10 mmol) otopi se u 35 mL 5 % NaHCO₃, ohladi na 0 °C te se dokapava 1.2 eq (1,13 mL, 12 mmol) anhidrida octene kiseline. Reakcija se prati jod/ninhidrinom na TLC-u. Reakcijska smjesa se miješa na sobnoj temperaturi 2–4 h. Vodena otopina se zatim zakiseli do pH 2–3 s otopinom 1M HCl. Tako se ostavi na 4 °C preko noći da istaloži produkt. Formirani bijeli talog se profiltrira i ispere s vodom te se dobije bijeli praškasti produkt 5 (1,20 g, 60 %): $R_f = 0,5$ (CH₂Cl₂/CH₃OH 10:1); ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ /ppm: 12,66 (s, 1H, OH), 8,17 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H, NHC*H), 7,31 – 7,19 (m, 5H, Ph), 4,42 – 4,37 (m, 1H, C*H), 3,03 (dd, $J = 13,8, 4,9$ Hz, 1H, Ha-CH₂Phe), 2,83 (dd, $J = 13,8, 9,6$ Hz, 1H, Hb-CH₂Phe), 1,77 (s, 3H, C=O-CH₃). Podaci karakterizacije odgovaraju literaturnom.¹⁷⁸

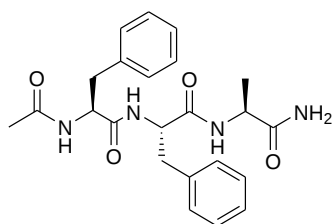
3.2.1.6. *N*-acetil-*L*-fenilalanin-*L*-fenilalanin-*L*-alaninat; *Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-OMe* (6)



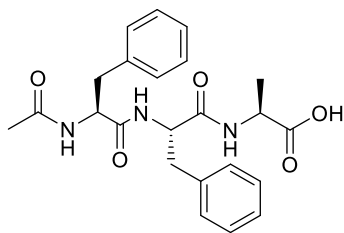
Spojevi 4 (0,95 g, 2,73 mmol) i 5 (0,57 g, 2,73 mmol) se otupe u suhom CH₂Cl₂ (20 mL). Reakcijska smjesa se ohladi na 0°C te se doda 1.2 eq EDC (0,63 g, 3,28 mmol), 0,1 eq HOBt (0,04 g, 0,273 mmol) i DIPEA (0,523 mL, 3,0 mmol). Reakcija se miješa na sobnoj temperaturi preko noći. Reakcijska smjesa se ispire s vodom, 10 % NaHCO₃, 10 % KHSO₄, vodom te suši Na₂SO₄. Otapalo se upari na rotacionom uparivaču te se dobije produkt 6 kao bijeli prah (0,703 g, 59 %): $R_f = 0,6$ (CH₂Cl₂/CH₃OH 20:1), t.t. = 214-216 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ /ppm: 8,40 (d, $J = 6,9$ Hz, 1H, NHC*H), 8,02 (dd, $J = 14,0, 8,3$ Hz, 2H, 2 x NHC*H), 7,32 – 7,13 (m, 10H, Ph), 4,59 – 4,39 (m, 2H, C*H_{Phe}), 4,36 – 4,24 (m, 1H, C*H_{Ala}), 3,62 (s, 3H, OCH₃), 2,99 (dd, $J = 13,9, 4,3$ Hz, 2H, CH₂Phe), 2,73 (dd, $J = 13,9, 9,7$ Hz, 2H, CH₂Phe), 1,72 (s, 3H, CH₃-C=O), 1,30 (d, $J = 7,3$ Hz, 3H, CH₃Ala). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): 172,8 (C=O), 171,1

(C=O), 170,8 (C=O), 169,1 (C=O), 137,9 (C_{Phe}), 137,6 (C_{Phe}), 129,2 (CH_{Phe}), 129,0 (CH_{Phe}), 127,9 (CH_{Phe}), 127,9 (CH_{Phe}), 126,2 (CH_{Phe}), 126,1 (CH_{Phe}), 53,8 (C*H_{Phe}), 53,4 (C*H_{Phe}), 51,8 (OCH₃), 47,6 (C*H_{Ala}), 37,4, 37,3 (2 x CH_{2Ph}), 22,4 (CH₃-C=O), 16,9 (CH_{3Ala}); FTIR-ATR $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3278 (NH), 1740 (COOMe), 1638 (amid I), 1537 (amid II) $[\alpha]_D = +29^\circ$ ($\gamma = 0,01 \text{ g mL}^{-1}$, MeOH); Elementna analiza za C₂₄H₂₉N₃O₅ (Mr = 439,50) izračunato (%): C 65,59, H 6,65, N 9,56, O 18,20, pronađeno: C 65,58, H 6,48, N 9,0, O 18,30. Podaci karakterizacije odgovaraju literaturnom.²²

3.2.1.7. *N*-acetil-*L*-fenialanin-*L*-fenilalanin-*L*-alanin amid; Ac-*L*-Phe-*L*-Phe-*L*-Ala-NH₂ (7)

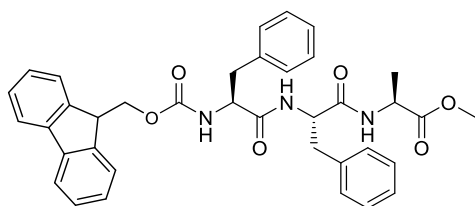


Spoj **6** (0,703 g, 1,598 mmol) se otopi u amonijaku u metanolu (70 mL) te se miješa pri 8 °C dok ne istaloži produkt. Talog se profiltrira i ispere s metanolom pri čemu se dobije bijeli praškasti produkt **7** (0,650 g, 96 %): $R_f = 0,5$ (CH₂Cl₂/CH₃OH 10:1), t.t. = 243–245 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm : 8,18 (d, $J = 7,9 \text{ Hz}$, 1H, NHC*H), 8,10 (d, $J = 8,2 \text{ Hz}$, 1H, NHC*H), 8,04 (d, $J = 7,6 \text{ Hz}$, 1H, NHC*H), 7,38 – 7,19 (m, 11H, 2 x Ph + NH_(NH₂)), 7,09 (s, 1H, NH_(NH₂)), 4,62 – 4,46 (m, 2H, 2 x C*H_{Phe}), 4,26 (p, $J = 6,8 \text{ Hz}$, 1H, C*H_{Ala}), 3,13 (dd, $J = 13,9, 4,5 \text{ Hz}$, 1H, Ha-CH_{2Ph}), 3,00 (dd, $J = 14,0, 4,1 \text{ Hz}$, 1H, Hb-CH_{2Ph}), 2,89 (dd, $J = 13,7, 9,4 \text{ Hz}$, 1H, Ha-CH_{2Ph}), 2,73 (dd, $J = 13,9, 10,0 \text{ Hz}$, 1H, Hb-CH_{2Ph}), 1,79 (s, 3H, CH₃-C=O), 1,28 (d, $J = 7,1 \text{ Hz}$, 3H, CH_{3Ala}). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm : 173,9 (C=O), 171,3 (C=O), 170,3 (C=O), 169,1 (C=O), 137,9 (C_{Phe}), 137,7 (C_{Phe}), 129,2 (CH_{Phe}), 129,0 (CH_{Phe}), 128,0 (CH_{Phe}), 127,9 (CH_{Phe}), 126,2 (CH_{Phe}), 126,1 (CH_{Phe}), 53,8 (C*H_{Phe}), 53,8 (C*H_{Phe}), 48,0 (C*H_{Ala}), 37,2 (CH_{2Ph}), 37,2 (CH_{2Ph}), 22,4 (CH₃-C=O), 18,3 (CH_{3Ala}); FTIR-ATR $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3277 (NH), 1679 (CONH₂), 1626 (amid I), 1544 (amid II); $[\alpha]_D = -18^\circ$ ($\gamma = 0,01 \text{ g mL}^{-1}$, MeOH); Elementna analiza za C₂₃H₂₈N₄O₄ (Mr = 424,49) izračunato (%): C 65,08, H 6,65, N 13,20, O 15,08, pronađeno: C 65,09, H 6,48, N 13,0, O 15,12. Podaci karakterizacije odgovaraju literaturnom.²²

3.2.1.8. *N*-acetil-*L*-fenialanin-*L*-fenilalanin-*L*-alanin; Ac-*L*-Phe-*L*-Phe-*L*-Ala-OH (**8**)

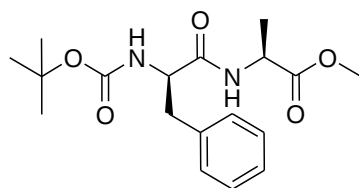
Spoj **6** (0,2 g, 0,46 mmol) se otopi u 2 mL metanola te se doda 0.8 mL 1M NaOH. Reakcija se miješa 24 h na sobnoj temperaturi. Metanol se upari te se vodena otopina zakiseli s 1M HCl sve do pH 2 kad se javlja taloženje produkta. Talog se profiltrira i ispere s vodom pri čemu se dobije bijeli praškasti produkt **8** (0,18 g, 96 %): $R_f = 0,2$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 10:1), t.t. = 205–208 °C ; ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ/ppm : 8,25 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H, NHC^*H), 8,03 (dd, $J = 17,9$, 8,4 Hz, 2H, 2 x NHC^*H), 7,27 – 7,15 (m, 10H, Ph), 4,56 – 4,53 (m, 1H, $\text{C}^*\text{H}_{\text{Phe}}$), 4,46 – 4,42 (m, 1H, $\text{C}^*\text{H}_{\text{Phe}}$), 4,21 (p, $J = 7,3$ Hz, 1H, $\text{C}^*\text{H}_{\text{Ala}}$), 3,06 (dd, $J = 14,0$, 4,3 Hz, 1H, CH_2Phe), 2,92 (dd, $J = 13,9$, 4,3 Hz, 1H, CH_2Phe), 2,81 (dd, $J = 14,0$, 9,5 Hz, 1H, CH_2Phe), 2,65 (dd, $J = 13,9$, 10,1 Hz, 1H, CH_2Phe), 1,71 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C=O}$), 1,29 (d, $J = 7,3$ Hz, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (151 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ/ppm : 173,9 (C=O), 171,2 (C=O), 170,6 (C=O), 169,0 (C=O), 137,9 (C_{Phe}), 137,6 (C_{Phe}), 129,3 (CH_{Phe}), 129,0 (CH_{Phe}), 127,9 (CH_{Phe}), 127,9 (CH_{Phe}), 126,2 (CH_{Phe}), 126,1 (CH_{Phe}), 53,8 ($\text{C}^*\text{H}_{\text{Phe}}$), 53,5 ($\text{C}^*\text{H}_{\text{Phe}}$), 47,6 ($\text{C}^*\text{H}_{\text{Ala}}$), 37,4 (CH_2Phe), 37,3 (CH_2Phe), 22,4 ($\text{CH}_3\text{-C=O}$), 17,2 (CH_3Ala); FTIR-ATR $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3265 (NH), 3064 (COOH), 1738 (C=O), 1642 (amid I), 1540 (amid II); $[\alpha]_D = -0,19^\circ$ ($\gamma = 0,004 \text{ g mL}^{-1}$, MeOH); Elementna analiza za $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_5$ ($M_r = 425,48$) izračunato (%): C 64,93, H 6,40, N 9,88, O 18,80, pronađeno: C 64,30, H 6,40, N 9,87, O 18,90. HRMS: m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ za $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_5$, izračunato: 426,2023, pronađeno: 426.2023.

3.2.1.9. (((9H-fluoren-9-il)metoksi)karbonil)-L-fenilalanil-L-fenilalanil-L-alaninat; Fmoc-L-Phe-L-Phe-L-Ala-OMe (**9**)

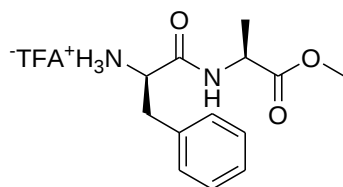


Fmoc-L-Phe-OH (1,62 g, 4,17 mmol) otopi se u 30 mL suhog CH₂Cl₂. Reakcijska smjesa ohladi se na 0°C te se doda 1.2 eq EDC (0,88 g, 4,59 mmol), 0,1 eq HOBT (0,05 g, 0,417 mmol). Reakcijskoj smjesi se kapaljkom doda spoj **4** (1,52 g, 4,17 mmol) prethodno otopljen u 10 mL suhog CH₂Cl₂ i DIPEA (0,8 mL, 4,587 mmol). Reakcija se miješa na sobnoj temperaturi preko noći pri čemu nastaje talog. Talog se profiltrira Büchnerovim lijevkom, a filtrat se ispiri s vodom, 10 % KHSO₄, vodom te suši Na₂SO₄. Smjesa se pročisti kolonskom kromatografijom (CH₂Cl₂/CH₃OH 10:1) čime se dobije čisti bijeli praškasti produkt **9** (0,7 g, 27 %): *R*_f = 0,9 (CH₂Cl₂/CH₃OH 10:1), t.t. = 193–195 °C; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 8,47 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H, NHC*H), 8,10 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H, NHC*H), 7,87, (d, *J* = 7,5 Hz, 2H, CH_{Fmoc}), 7,61 (dd, *J* = 12,7, 7,5 Hz, 2H, CH_{Fmoc}), 7,52 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H, NHC*H), 7,43–7,38 (m, 2H, CH_{Fmoc}), 7,32 – 7,14 (m, 12H, Ph + 2 x CH_{Fmoc}), 4,66–4,56 (m, 1H, C*H_{Phe}), 4,30 (p, *J* = 7,2 Hz, 1H, C*H_{Ala}), 4,36–4,09 (m, 4H, C*H_{Phe} + CH₂+CH), 3,62 (s, 3H, OCH₃), 3,05 (dd, *J* = 13,9, 4,8 Hz, 1H, CH₂_{Phe}), 2,91 (dd, *J* = 13,8, 3,9 Hz, 1H, CH₂_{Phe}), 2,82 (dd, *J* = 14,0, 9,2 Hz, 1H, CH₂_{Phe}), 2,48 (dd, *J* = 13,7, 10,8 Hz, 1H, CH₂_{Phe}), 1,22 (d, *J* = 7,3 Hz, 3H, CH₃). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 172,8 (C=O), 171,3 (C=O), 170,8 (C=O), 155,6 (C=O), 143,7 (C_{Fmoc}), 143,6 (C_{Fmoc}), 140,6 (C_{Fmoc}), 140,6 (C_{Fmoc}), 138,0 (C_{Phe}), 137,5 (C_{Phe}), 129,2 (CH_{Phe}), 129,1 (CH_{Phe}), 128,9 (CH_{Phe}), 127,9 (CH_{Phe}), 127,6 (CH_{Fmoc}), 127,0 (CH_{Fmoc}), 126,2 (CH_{Phe}), 126,1 (CH_{Phe}), 125,3 (CH_{Fmoc}), 125,2 (CH_{Fmoc}), 120,0 (CH_{Fmoc}), 65,6 (CH₂), 56,1 (C*H_{Phe}), 53,4 (C*H_{Phe}), 51,8 (OCH₃), 47,6 (C*H_{Ala}), 46,5 (CH), 37,6 (CH₂_{Phe}), 37,4 (CH₂_{Phe}), 16,8 (CH₃_{Ala}); FTIR-ATR $\tilde{\nu}$ /cm⁻¹: 3305 (NH), 1744 (COOMe), 1641 (amid I), 1536 (amid II); [α]_D = +24° (γ = 0,003 g mL⁻¹, EtOAc); Elementna analiza za C₃₇H₃₇N₃O₆ (Mr = 619,71) izračunato (%): C 71,71, H 6,02, N 6,78, O 15,49, pronađeno: C 71,68, H 6,02, N 6,70, O 15,51; HRMS: *m/z* [M+H]⁺ za C₃₇H₃₇N₃O₆, izračunato: 619,7180 pronađeno: 619,2682.

3.2.2. Priprava derivata s aminokiselinskom sekvencom L-Phe-D-Phe-L-Ala

3.2.2.1. Metil(*tert*-butoksikarbonil)-D-fenilalanil-L-alaninat; Boc-D-Phe-L-Ala-OMe (**10**)

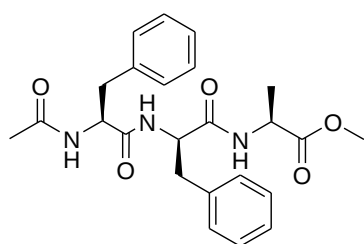
Boc-D-PheOH (0,6 g, 2,3 mmol) otopljen je u 5 mL suhog CH₂Cl₂ te je dodan spoj **2** (0,317 g, 2,3 mmol) i DIPEA (0,46 ml, 2,3 mmol). Reakcijska smjesa se ohladi na 0 °C nakon čega se doda DCC (0,47 g, 2,3 mmol) i katalitička količina DMAP (1–2 % količine reaktanata). Reakcija se miješa na 0 °C 30 min nakon čega se nastavi miješati na sobnoj temperaturi preko noći. Reakcija se zatim profiltrira nekoliko puta Büchnerovim lijevkom pri čemu se dobije proziran filtrat žućkaste boje. Filtrat se ispiri vodom, 10 % NaHCO₃, 10 % KHSO₄, vodom te suši Na₂SO₄. Otapalo se upari na rotacionom uparivaču te se produkt iskristalizira dodatkom petroletera. Dobiven je produkt Boc-D-Phe-L-Ala-OMe (**10**) kao bijeli prah (0,518 g, 64 %): *R*_f = 0,6 (Petroleter/EtOAc 7:4); ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 8,30 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H, NHC*H), 7,25 – 7,17 (m, 5H, Ph), 6,84 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H, NHC*H), 4,32 – 4,16 (m, 2H, C*H_{Phe} and C*H_{Ala}), 3,63 (s, 3H, OCH₃), 2,95 – 2,70 (m, 2H, CH₂Phe), 1,30–1,22 (m, *J* = 7,2 Hz, 12H, Me₃C-C=O + CH₃Ala). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 172,8 (C=O), 171,3 (C=O), 155,0 (O-C=O), 137,9 (CH_{Phe}), 129,2 (CH_{Phe}), 127,9 (CH_{Phe}), 126,1 (CH_{Phe}), 77,9 (C(CH₃)₃), 55,3 (C*HPhe), 51,8 (OCH₃), 47,5 (C*HAla), 37,8 (CH₂Phe), 28,1 (s, 9H, Me₃C-O-), 17,1 (CH₃Ala).

3.2.2.2. *N*-(trifluoroacetil)-D-fenilalanin-L-alaninat; NH₃⁺TFA⁻-D-Phe-L-Ala-OMe (**11**)

Spoj **10** (0,47 g, 1,33 mmol) otopi se u suhom CH₂Cl₂ pri 0°C i doda se 1 mL TFA. Reakcijska smjesa se miješa preko noći na sobnoj temperaturi. Otapalo se upari na rotacionom uparivaču nakon čega se doda toluen kako bi se uklonio višak TFA. Uparavanjem toluena dobije se uljasti produkt NH₃⁺TFA⁻-D-Phe-L-Ala-OMe (**11**) (0,485 g, 100 %): *R*_f = 0,4 (CH₂Cl₂/CH₃OH 10:1);

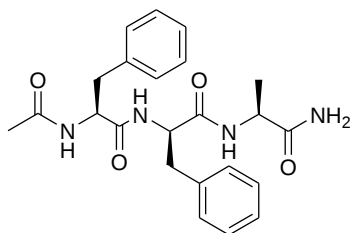
^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ/ppm : 8,82 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H, NHC^*H), 8,25 (s, 3H, NH_3^+), 7,36–7,16 (m, 5H, Ph), 4,32 (p, $J = 7,2$ Hz, 1H, $\text{C}^*\text{H}_{\text{Phe}}$), 4,06 (d, $J = 4,9$ Hz, 1H, $\text{C}^*\text{H}_{\text{Ala}}$), 3,04 (d, $J = 7,1$ Hz, 2H, CH_2Phe), 1,14 (d, $J = 7,2$ Hz, 3H, CH_3Ala).

3.2.2.3. *N*-acetil-*L*-fenilalanin-*D*-fenilalanin-*L*-alaninat; Ac-*L*-Phe-*D*-Phe-*L*-Ala-OMe (**12**)



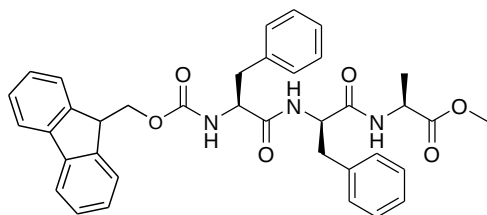
Spoj **4** (0,28 g, 1,33 mmol) i **11** (0,49 g, 1,33 mmol) se otope u suhom CH_2Cl_2 (20 mL). Reakcijska smjesa se ohladi na 0°C te se doda 1.2 eq EDC (0,3 g, 1,6 mmol), 0,1 eq HOBt (0,01 g, 0,133 mmol) i DIPEA (0,26 mL, 1,46 mmol). Reakcija se miješa na sobnoj temperaturi preko noći. Reakcijska smjesa se ispiri s vodom, 10 % NaHCO_3 , 10 % KHSO_4 , vodom te suši Na_2SO_4 . Otapalo se upari na rotacionom uparivaču te se dobije produkt **12** kao svijetlo žuta krutina (0,45 g, 76 %): $R_f = 0,7$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 10:1), t.t. = $211\text{--}214^\circ\text{C}$; ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ/ppm : 8,45 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H, NHC^*H), 8,38 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H, NHC^*H), 8,04 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H, NHC^*H), 7,24 – 7,10 (m, 10H, Ph), 4,59 – 4,49 (m, 1H, $\text{C}^*\text{H}_{\text{Phe}}$), 4,48 – 4,46 (m, 1H, $\text{C}^*\text{H}_{\text{Phe}}$), 4,31 (p, $J = 7,3$ Hz, 1H, $\text{C}^*\text{H}_{\text{Ala}}$), 3,64 (s, 3H, OCH_3), 3,01 (dd, $J = 13,6$, 4,5 Hz, 1H, CH_2Phe), 2,70 (dd, $J = 13,6$, 10,1 Hz, 1H, CH_2Phe), 2,60 (dd, $J = 13,7$, 4,2 Hz, 1H, CH_2Phe), 2,58 (dd, $J = 13,7$, 10,0 Hz, 1H, CH_2Phe), 1,73 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-C=O}$), 1,26 (d, $J = 7,2$ Hz, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ/ppm : 172,8 (C=O), 171,2 (C=O), 170,7 (C=O), 169,2 (C=O), 137,9 (C_{Phe}), 137,7 (C_{Phe}), 129,3 (CH_{Phe}), 129,1 (CH_{Phe}), 127,9 (CH_{Phe}), 127,9 (CH_{Phe}), 126,3 (CH_{Phe}), 126,1 (CH_{Phe}), 54,1 ($\text{C}^*\text{H}_{\text{Phe}}$), 53,5 ($\text{C}^*\text{H}_{\text{Phe}}$), 51,9 (OCH_3), 47,5 ($\text{C}^*\text{H}_{\text{Ala}}$), 37,9 (CH_2Phe), 37,4 (CH_2Phe), 22,3 (O=CH_3), 17,1 (CH_3Ala); FTIR-ATR $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3279 (NH), 1743 (COOMe), 1634 (amid I), 1538 (amid II); $[\alpha]_D = +18^\circ$ ($\gamma = 0,005 \text{ g mL}^{-1}$, MeOH); Elementna analiza za $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_5$ ($M_r = 439,50$) izračunato (%): C 65,59, H 6,65, N 9,56, O 18,20, pronađeno: C 65,50, H 6,65, N 9,57, O 18,30; HRMS: m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ za, $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_5$, izračunato: 439,5120, pronađeno: 439,2170.

3.2.2.4. *N*-acetil-*L*-fenialanin-*D*-fenilalanin-*L*-alanin amid; Ac-*L*-Phe-*D*-Phe-*L*-Ala-NH₂ (13)



Spoj **12** (0,3 g, 0,68 mmol) se otopi u zasićenoj otopini amonijaka u metanolu (30 mL) te se miješa pri 8 °C dok ne istaloži produkt. Talog se profiltrira i ispere s metanolom pri čemu se dobije bijeli praškasti produkt **13** (0,25 g, 86 %): $R_f = 0,5$ (CH₂Cl₂/CH₃OH 10:1), t.t. = 243–245°C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 8,36 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H, NH*CH), 8,10 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H, NH*CH), 8,02 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H, NH*CH), 7,26 – 7,14 (m, 10H, 2 x Ph), 7,10 – 7,08 (m, 2H, NH₂), 4,56 – 4,40 (m, 2H, 2 x C*H_{Phe}), 4,20 (p, $J = 7,2$ Hz, 1H, C*H_{Ala}), 3,05 (dd, $J = 13,6, 4,9$ Hz, 1H, CH₂Phe), 2,74 (dd, $J = 13,6, 9,8$ Hz, 1H, CH₂Phe), 2,64 (dd, $J = 13,8, 4,4$ Hz, 1H, CH₂Phe), 2,49 – 2,46 (m, 1H, CH₂Phe), 1,72 (s, 3H, OCH₃), 1,16 (d, $J = 7,1$ Hz, 3H, CH₃Ala). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ/ppm: 173,9 (C=O), 171,2 (C=O), 170,4 (C=O), 169,2 (C=O), 137,9 (C_{Phe}), 137,7 (C_{Phe}), 129,3 (CH_{Phe}), 129,0 (CH_{Phe}), 127,9 (CH_{Phe}), 126,2 (CH_{Phe}), 126,1 (CH_{Phe}), 126,3 (CH_{Phe}), 54,1 (C*H_{Phe}), 53,9 (C*H_{Phe}), 47,9 (C*H_{Ala}), 37,6 (CH₂Phe), 37,5 (CH₂Phe), 22,6 (O=CH₃), 18,2 (CH₃Ala); FTIR-ATR $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3267 (NH), 1626 (amid I), 1540 (amid II); $[\alpha]_D = +4^\circ$ ($\gamma = 0,005 \text{ g mL}^{-1}$, MeOH); Elementna analiza za C₂₃H₂₈N₄O₄ (Mr = 424,49) izračunato (%): C 65,08, H 6,65, N 13,20, O 15,08, pronađeno: C 65,10, H 6,65, N 13,15, O 15,08; HRMS: m/z [M+H]⁺ za, C₂₃H₂₈N₄O₄, izračunato: 424,5010, pronađeno: 424,2111.

3.2.2.5. (((9H-fluoren-9-il)metoksi)karbonil)-L-fenilalanil-D-fenilalanil-L-alaninat; Fmoc-L-Phe-D-Phe-L-Ala-OMe (**14**)



Fmoc-L-Phe-OH (1,1 g, 2,85 mmol) otopi se u 20 mL suhog CH_2Cl_2 . Reakcijska smjesa ohladi se na 0°C te se doda 1.2 eq EDC (0,6 g, 3,42 mmol), 0,1 eq HOBt (0,04 g, 0,285 mmol). Reakcijskoj smjesi se kapaljkom doda spoj **11** (1,04 g, 2,85 mmol) prethodno otopljen u 10 mL suhog CH_2Cl_2 i DIPEA (0,55 mL, 3,42 mmol). Reakcija se miješa na sobnoj temperaturi preko noći pri čemu nastaje talog. Talog se profiltrira Büchnerovim lijevkom, a filtrat se ispiri s vodom, 10 % KHSO_4 , vodom te suši Na_2SO_4 . Smjesa se pročisti kolonskom kromatografijom ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 10:1) čime se dobije čisti bijeli praškasti produkt **14** (1,3 g, 73 %): $R_f = 0,9$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 10:1), t.t. = $174\text{--}176^\circ\text{C}$; ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ/ppm : 8.41 (dd, $J = 12,8, 8,0$ Hz, 2H, 2 x NHC^*H), 7.87 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H, CH_{Fmoc}), 7.62 (dd, $J = 11,7, 7,5$ Hz, 2H, CH_{Fmoc}), 7.52 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H, NHC^*H), 7.40 (td, $J = 7,4, 2,6$ Hz, 2H, CH_{Fmoc}), 7.31 – 7.14 (m, 12H, Ph + 2 x CH_{Fmoc}), 4.66 – 4.61 (m, 1H, $\text{C}^*\text{H}_{\text{Phe}}$), 4.30 – 4.23 (m, 2H, $\text{C}^*\text{H}_{\text{Phe}}$ + $\text{C}^*\text{H}_{\text{Ala}}$), 4.15 – 4.08 (m, 3H, CH_2 + CH), 3.62 (s, 3H, OCH_3), 3.00 (dd, $J = 13,6, 4,7$ Hz, 1H, CH_2Phe), 2.75 (dd, $J = 13,5, 9,9$ Hz, 1H, CH_2Phe), 2.61 (dd, $J = 13,7, 3,6$ Hz, 1H, CH_2Phe), 2.48 (dd, $J = 13,7, 10,0$ Hz, 1H, CH_2Phe), 1.22 (d, $J = 7,3$ Hz, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ/ppm : 172,8 (C=O), 171,3 (C=O), 170,7 (C=O), 155,7 (C=O), 143,7 (C_{Fmoc}), 143,7 (C_{Fmoc}), 140,6 (C_{Fmoc}), 140,6 (C_{Fmoc}), 138,1 (C_{Phe}), 137,5 (C_{Phe}), 129,3 (CH_{Phe}), 129,2 (CH_{Phe}), 127,9 (CH_{Phe}), 127,9 (CH_{Phe}), 127,6 (CH_{Fmoc}), 127,0 (CH_{Fmoc}), 126,3 (CH_{Phe}), 126,1 (CH_{Phe}), 125,3 (CH_{Fmoc}), 125,2 (CH_{Fmoc}), 120,0 (CH_{Fmoc}), 65,6 (CH_2), 56,1 ($\text{C}^*\text{H}_{\text{Phe}}$), 53,4 ($\text{C}^*\text{H}_{\text{Phe}}$), 51,9 (OCH_3), 47,5 ($\text{C}^*\text{H}_{\text{Ala}}$), 46,5 (CH), 38,2 (CH_2Phe), 37,3 (CH_2Phe), 17,1 (CH_3Ala); FTIR-ATR $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3281 (NH), 1741 (COOMe), 1645 (amid I), 1536 (amid II); $[\alpha]_D = +8^\circ$ ($\gamma = 0,01 \text{ g mL}^{-1}$, MeOH); Elementna analiza za $\text{C}_{37}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_6$ (Mr = 619,71) izračunato (%): C 71,71, H 6,02, N 6,78, O 15,49, pronađeno: C 71,69, H 6,02, N 6,80, O 15,50; HRMS: m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ za, $\text{C}_{37}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_6$, izračunato: 619,7180, pronađeno: 619,2682.

3.3. Geliranje tripeptidnih derivata

Gelirajuća svojstva gelatora ispitana su na uzorcima mase 5 mg otopljenih grijanjem u ispitivanom otapalu određenog volumena. Gelovi se postupno hlade na sobnu temperaturu. Ukoliko je hlađenjem zamijećeno stvaranje gela (provjera okretanjem bočice), dodana je nova količina otapala, a gel se ponovno uz zagrijavanje otopi, te se istim postupkom provjerava nastajanje gela s novom količinom otapala. Postupak otapanja gela i ponovnog dodavanja otapala ponavlja se do maksimalne količine otapala pri kojoj ne nastaje čvrsti gel (gel pada okretanjem epruvete). Takvim postupkom utvrđuje se maksimalni volumen otapala kojeg gelator može gelirati. Kod netopljivih spojeva u izabranom otapalu, postupak se provodi otapanjem spoja u najmanjoj količini otapala u kojem se otapa, a zatim se dodaje otapalo manje ili veće polarnosti do nastanka gela. Postupak dodavanja otapala ponavlja se sve dok se više ne stvara čvrsti gel. Gelirajuća svojstva ispitana su i u ovisnosti o pH gdje se postupak geliranja ponavlja koristeći otopine pufera različitih pH.

3.4. Priprema kompozitnog hidrogela Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH₂ s liposomima i proteinom

3.4.1. Priprema pufera

0,1 mol dm⁻³ otopina fosfatnog pufera, pH 7,4, pripremljena je miješanjem 77,4 mL 1 mol dm⁻³ Na₂HPO₄ i 22,6 mL 1 mol dm⁻³ NaH₂PO₄ u 1 L vode visoke čistoće (dobivena pročišćavanjem na sustavu Simplicity 185 (Milipore, USA)).

3.4.2. Priprema liposoma

Multilamelarni liposomi priređeni su metodom hidratacije tankog lipidnog filma.¹⁷⁹ Fosfolipidi (jajčani fosfatidilkolin (PC) i kolesterol (Chol)) otope se u smjesi kloroform:metanol (2:1) u molarnom omjeru 3:2. DPPC i DMPC liposomi otope se u smjesi kloroform:metanol (2:1). Konačna koncentracija lipida je 30 mmol dm⁻³. Otapalo se upari pod niskim tlakom koristeći rotacijski uparivač (Rotavapor® RE-121, Büchi). Za DSC mjerenja, lipidni film se hidratizira s 1 mL fosfatnog pufera (PBS) odnosno deuterijevog oksida (D₂O) pomoću vorteksa. Liposomska suspenzija se ostavi preko noći na 4 °C da se stabilizira. Veličina liposoma je reducirana ekstrudiranjem multilamelarnih vezikula pomoću polikarbonatnih membrana od 800, 400 i 200 nm koristeći 0,5 mL ekstruder (LiposoFast, Avestin Inc., Canada). Ugrađivanje BSA i OVA u liposome provedena je hidratiziranjem prethodno osušenog lipidnog filma

otopinom BSA (3 mg mL^{-1} u fosfatnom puferu) odnosno OVA (1 mg mL^{-1} u fosfatnom puferu). Liposomske suspenzije, bez odvajanja neugrađenog materijala, korištene su za imunizaciju i mjerenja fizikalno-kemijskih svojstava liposoma.

3.4.3. *Dinamičko raspršenje svjetlosti (DLS) liposoma*

Distribucija veličina čestica i zeta potencijal priređenih liposoma mjereni su na instrumentu Zetasizer Nano US (Malvern, UK). Korišteno je lasersko zračenje (532 nm), a intenzitet raspršenja detektiran je pod kutem od 173° . Mjerenja su provedena na 25°C . Dobiveni rezultati obrađeni su pomoću programa Zetasizer 6.20 (Malvern instruments). Liposomska suspenzija razrijeđena je 10x fiziološkom otopinom. Veličina liposoma izražena je kao srednja vrijednost (z-srednja). Mjerenja su provedena 6 puta te su rezultati izraženi kao srednja vrijednost. Mjerenja zeta potencijala liposoma provedeno je u plastičnim kivetama sa zlatnom žicom. Svaki uzorak je mjeren 3 puta te su rezultati izraženi kao srednja vrijednost.

3.4.4. *Priprema kompozita hidrogela Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH₂ s liposomima i proteinima*

Određena je sposobnost geliranja Ac-FFA-NH₂ u prisutnosti liposoma i proteina. Peptidni hidrogelator otopljen je u Mili-Q vodi zagrijavanjem nakon čega se dodaje liposomska suspenzija (30 mmol dm^{-3}) pri 35°C u različitim molarnim omjerima (1:10, 1:5, 1:2,5, 1:1). Kontrolni gel napravljen je na isti način bez dodatka liposoma. Sposobnost geliranja ispitana je okretanjem bočice. Isti postupak ponovljen je s dodacima određenog volumena (10, 20, 30, 100, 110 μL) početne otopine BSA ($\gamma_0 = 3 \text{ mg mL}^{-1}$, $c_0 = 4,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$).

3.4.5. *Diferencijacijska skenirajuća kalorimetrija (DSC)*

Dipalmitoifosfatidilkolin (DPPC) i dimiristoilfosfatidilkolin (DMPC) korišteni su za pripremu liposoma i DSC mjerenja u koncentracijama 30 mmol dm^{-3} . U uzorak hidrogela Ac-FFA-NH₂ dodani su alikvoti, prethodno pripremljenih DPPC i DMPC liposoma, na 35°C , u koncentraciji gelatora $17,56 \text{ mmol dm}^{-3}$ i $7,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ liposoma. Svi uzorci su degazirani 15 min prije mjerenja na instrumentu. Kalorimetrijski eksperimenti provedeni su na mikrokolorimetru Nano-DSC, TA Instruments (New Castle, USA) sa temperaturnim povećanjem od 1°C min^{-1} . Temperaturni domet za DPPC je $10 - 60^\circ\text{C}$, a za DMPC $5 - 60^\circ\text{C}$. Volumen ćelije je $300 \mu\text{L}$. Podaci su obrađeni na TA Instruments Nano Analyze programskom

paketu. Sve suspenzije su mjerene dva puta (dva punjenja) u dva ciklusa zagrijavanja i hlađenja. Referentna otopina (Mili-Q) mjerena je jednom u dva ciklusa grijanja i hlađenja te je oduzeta kao bazna linija.

3.4.6. FTIR-ATR

FTIR-ATR spektri snimljeni su na INVENIO-S Bruker spektrofotometru s BioATR II jedinicom i fotonaponskim LN-MCT detektorom. Postavljen je KBr razdjelnik snopa na 1 mm, a detektor je radio pri brzini skeniranja od 15 kHz za visoku osjetljivost mjerenja. ATR jedinica je pročišćena propuhivanjem plinovitog N_2 iz vanjskog izvora. Jedinica BioATR II koristi dizajn kružne tehnologije dvostrukog kristala (DCT) s gornjim ATR kristalom od silicija i donjim kristalom od cinkova selenida ($ZnSe$), koji nije u kontaktu s uzorkom. Sustav pruža preformanse multirefleksije s duljinom puta od 6–8 μm i zahtjeva $\sim 30 \mu L$ uzorka. Temperaturna kontrola provedena je pomoću vodene kupelji Huber Ministat 125 postavljene na $25^\circ C$ s brzinom zagrijavanja od $1^\circ C/min$. Uzorci, uključujući DPPC liposoma, Ac-FFA- NH_2 hidrogel i kompozitni hidrogel Ac-FFA- NH_2 s liposomima u D_2O pipetirani su izravno na ATR kristal u volumenu od $25 \mu L$. Uzorci su mjereni tri puta pri temperaturi od $25^\circ C$. Spektri su snimani pri razlučivanju od $2 cm^{-1}$ i rezultat su uprosječenja 128 snimke po uzorku. Prikupljanje, obrada i evaluacija podataka provedeni su pomoću OPUS-a 8.5 SP1 programom.¹⁸⁰

3.5. Priprema hidrogela Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala- NH_2 s doksorubicinom i nanoformulacijama doksorubicina

3.5.1. Hidrogel s doksorubicinom

Ac-FFA- NH_2 /DOX hidrogel je pripremljen istom procedurom prethodno opisanom u poglavlju 3.4.4. dodavanjem određenog volumena (10, 20, 30, 50 i $100 \mu L$) početne otopine DOX ($\gamma_0 = 2 mg mL^{-1}$, $c_0 = 1 \times 10^{-4} mol dm^{-3}$) pri čemu je gel konstantne mase po volumenu otapala od 0,4 %.

3.5.2. Hidrogel s liposomskom formulacijom DOX

Ac-FFA-NH₂/liposomska formulacija DOX kompozitni hidrogel je pripremljen istom procedurom prethodno opisanom u poglavlju 3.4.4. dodavanjem određenog volumena (0,4, 0,8, 1,2, 2 i 4 µL) početne otopine liposomske formulacije DOX ($\gamma_0 = 50 \text{ mg mL}^{-1}$, $c_0 = 8,6 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) pri čemu je gel konstantne mase po volumenu otapala od 0,4 %.

3.5.3. Hidrogel s PLGA-Dox

Ac-FFA-NH₂/PLGA-Dox kompozitni hidrogel je pripremljen istom procedurom prethodno opisanom u poglavlju 3.4.4. dodavanjem određenog volumena (10, 20, 30, 50 i 100 µL) početne otopine PLGA-Dox ($\gamma_0 = 1,9 \text{ mg mL}^{-1}$, $c_0 = 3,3 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) pri čemu je gel konstantne mase po volumenu otapala od 0,4 %.

3.6. Morfološka karakterizacija kompozitnih hidrogelova transmisijском elektronskom mikroskopijom i mikroskopom atomskih sila

Istraživanje morfologije liposoma, hidrogela, proteina i kompozitnih hidrogelova provedeno je na elektronskom mikroskopu Zeiss EM 10A, pri naponu ubrzanja od 60 kV (na Institutu Ruđer Bošković). Tanki film gela se stavi na mrežicu te se sjenča paladijem ili oboji pomoću 2 % vodene otopine kalijeve soli fosfovolframske kiseline (H₃PW₁₂O₄₀, pWk). Kap otopine pWk, neutralizirane s NaOH do pH 7 stavi se na uzorak gela na mrežici, a višak boje se ukloni nakon 30 sekundi pomoću filter papira. Uzorci nosača s ugrađenim FITC-BSA snimljeni su na laserskom pretražnom konfokalnom mikroskopu Leica TCS SP8. Slike su dobivene jednosmjernim xyz skenirajućim načinom rada, brzinom od 400 Hz. Također, koristio se AFM mikroskop proizvođača Bruker, a proba se sastojala od poluge sa šiljkom (SiN₃, SiO₂, C-nanocijev). AFM mikroskop radi na principu mjerenja interakcije između površine i vrlo oštrog šiljka koji je na savitljivoj poluzi. Na taj način je mapirana željena površina. Metoda je nedestruktivna i može se raditi u prirodnoj formi materijala bez sjenčanja uzorka kao što je bilo potrebno kod TEM-a

3.7. In vivo ispitivanje imunostimulacijske aktivnosti peptidnih hidrogelova

3.7.1. Pokusne životinje i imunizacija

Eksperiment na miševima proveden je prema hrvatskom zakonu za zaštitu životinja (2017), koji udovoljava EC Direktivi (2010/63/EU). Na osnovu pozitivnog mišljenja Etičkog povjerenstva za zaštitu životinja koje se koriste u znanstvene svrhe dobivena je dozvola HR-POK-009, Ministarstva poljoprivrede, Uprave za veterinarstvo i sigurnost hrane kojim se odobravaju *in vivo* testiranja na miševima. NIH/OlaHsd miševi uzgojeni su na Imunološkom zavodu u Zagrebu, Hrvatska. Svi miševi su ženke od 2,0–2,5 mjeseci. NIH/OlaHsd miševi (pet po grupi) su imunizirani potkožno u bazu repa i docijepljeni su dva puta u razmaku od 21 dan. Apliciran volumen u eksperimentalnim grupama iznosio je 0,1 mL po mišu, što odgovara 10 µg OVA-e, 200 µg PGM, 400 µg hidrogelatora i 0,30 µmol MDP. Miševi su anestezirani (ketamin/xilazin (25 mg kg⁻¹, po mišu) prije vađenja krvi iz aksilarnog pleksusa 7 dana nakon zadnje doze. Individualni serumi pojedinih životinja su dekomplementirani na 56 °C 30 min i spremljeni na –20 °C do analize.

3.7.2. ELISA za kvantitativno određivanje anti-OVA IgG

Količina ukupnih OVA-specifičnih IgG, IgG1 i IgG2a u serumu miševa određeni su analitičkim biokemijskim testom ELISA (engl. *enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Ukratko, ELISA pločice prekrivene su 1,5 µg mL⁻¹ otopinom OVA u karbonatnom puferu pH 9,6 te su inkubirane preko noći na sobnoj temperaturi. Nespecifično vezanje protutijela je blokirano 0,5 % w/v otopinom BSA u PBS-T (0,05 % (v/v) Tween 20 u PBS-u) na 2 h pri 37 °C. Nakon ispiranja, pet serijskih razrjeđivanja mišjeg seruma i standardnih uzoraka, dodani su u duplikatima. Uzorci su inkubirani preko noći na sobnoj temperaturi, isprani i analizirani su OVA-specifični IgG inkubacijom s HRP-konjugiranim kozjim anti-mišjim IgG (2 h pri 37 °C). Nakon ispiranja, uzorci su inkubirani s 0,6 mg mL⁻¹ otopinom OPD u citrat fosfatnom puferu, pH 5,0 s 0,5 µL 30 % H₂O₂/mL 30 min pri sobnoj temperaturi u mraku. Enzimska reakcija zaustavljena je s 12,5 % H₂SO₄. Apsorbancija na 492 nm izmjerena je koristeći čitač mikrotitracijskih pločica (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD). Prilikom određivanja OVA-specifičnih IgG1 i IgG2a, uzorci su inkubirani s biotin-konjugiranim štakorskim anti-mišjim IgG1 ili IgG2a (2 h pri 37 °C) i naknadno sa streptavidin-peroksidazom tijekom 2 h pri 37 °C. Nakon ispitivanja, dodana je otopina supstrata OPD i inkubirana 30 min

na sobnoj temperaturi u mraku, kao što je prethodno opisano. Enzimska reakcija zaustavljena je s 12,5 % H₂SO₄. Apsorbancija na 492 nm izmjerena je koristeći čitač mikrotitracijskih pločica. Relativne količine nastalih protutijela određene su testom paralelnih pravaca koristeći standardne uzorke anti-OVA IgG, anti-OVA IgG1 i anti-OVA IgG2a protutijela s proizvoljno pripisanim vrijednostima 20 000 AU/mL; 400 000 AU/mL i 5000 AU/mL.

3.7.3. Statistička obrada podataka

Analiza podataka provedena je koristeći program Statistica 6.0 za Windowse, StatSoft Inc. Statistička značajnost procijenjena je Kruskal-Wallisovim testom, nakon čega su provedene post hoc usporedbe. Vrijednost $p < 0,05$ se smatra statistički značajnom.

3.8. Otpuštanje doksorubicina i biomolekula iz hidrogela Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH₂

3.8.1. Određivanje baždarnih dijagrama

Baždarni dijagrami spojeva hidrogela Ac-FFA-NH₂, DOX, liposomske formulacije DOX (Myocet), PLGA-Dox i BSA dobiveni su mjerenjem apsorbancije različitih koncentracija koje su dobivene razrjeđivanjem početne standardne otopine (engl. *stock solution*). Početne standardne otopine pripremljene su otapanjem spoja Ac-FFA-NH₂ ($c_0 = 4,3 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u 0,1 mol dm⁻³ fosfatnom puferu (Na₂HPO₄/NaH₂PO₄) pH 7,4, dok su preostali spojevi otopljeni u vodi (Mili-Q); DOX ($\gamma_0 = 2 \text{ mg mL}^{-1}$; $c_0 = 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$), Myocet ($\gamma_0 = 50 \text{ mg mL}^{-1}$; $c_0 = 8,6 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$), PLGA-Dox ($\gamma_0 = 1,9 \text{ mg mL}^{-1}$; $c_0 = 3,3 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) i BSA ($c_0 = 3,3 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$). Prvo je snimljen UV-Vis spektar puferske otopine odnosno Mili-Q vode (2 mL u kivetu) kako bi se dobila bazna linija. U istu kvarcnu kivetu (10 mm) dodavani su alikvoti standardne otopine te je nakon svakog dodavanja sniman UV-Vis spektar u području valnih duljina od 700 do 200 nm. Vrijednostima pri maksimalnoj apsorbanciji u ovisnosti o koncentraciji, dobivena je jednadžba pravca pomoću koje se u daljnjem eksperimentu računala koncentracija otpuštenog spoja iz hidrogela u prihvatni medij (fosfatni pufer, pH 7,4). Titracijski podaci su obrađeni u Origin 7.0 programu, korigirani na razrjeđenje.

3.8.2. Mjerenje otpuštanja UV-Vis optičkom sondom

U bočicu se izvaže hidrogelator (5 mg) i doda destilirana voda te se zagrijava dok se sve ne otopi. Topla otopina prenese se pipetom u falcon epruvetu od 15 mL te pri temperaturi 40 °C doda se određeni volumen BSA ($\gamma_0 = 3 \text{ mg mL}^{-1}$; $c_0 = 4,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $V(\text{BSA}) = 244 \text{ }\mu\text{L}$) i liposoma ($c_0 = 30 \text{ mmol dm}^{-3}$) koji odgovara maksimalnoj količini pri kojoj nastaje gel (tablica 9). Dodani volumen lijeka doksorubicina ($\gamma_0 = 2 \text{ mg mL}^{-1}$; $c_0 = 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$), Myoceta ($\gamma_0 = 50 \text{ mg mL}^{-1}$; $c_0 = 8,6 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$), PLGA-Dox ($\gamma_0 = 1,9 \text{ mg mL}^{-1}$; $c_0 = 3,3 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) odgovara konačnoj koncentraciji $c = 6,89 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. Ukupan volumen u bočicama s gelom iznosi 1 mL. Kontrolni gelovi pripremaju se bez dodatka spoja. Tako priređeni gelovi ostave se preko noći za stabilizaciju. U bočice s gelovima dodaje se po 6 mL 0,1 mol dm⁻³ fosfatnog pufera Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (pH 7,4), koji se prethodno sonificira 30 minuta na ultrazvučnoj kupelji kako bi se uklonili mjehurići zraka. Tijekom 24 sata (svakih 30 minuta) mjeri se apsorbancija prihvatnog medija UV-Vis optičkom sondom. Koncentracije otpuštenog lijeka u određenom vremenu računaju se preko baždarnog dijagrama spoja. Titracijski podaci su obrađeni u Origin 7.0 programu, korigirani na razrjeđenje.

3.8.3. Mjerenje otpuštanja UV-Vis u kiveti

U bočicu se izvaže hidrogelator (2 mg) i doda fosfatni pufer Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7,4 te se zagrijava dok se sve ne otopi te pri temperaturi 40 °C doda se određeni volumen BSA ($\gamma_0 = 3 \text{ mg mL}^{-1}$; $c_0 = 4,5 \times 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$) i liposoma ($c_0 = 30 \text{ mmol dm}^{-3}$) koji odgovara maksimalnoj količini pri kojoj nastaje gel (tablica 8, tablica 9) te ukupan volumen u bočici s gelom iznosi 0,6 mL. Kontrolni gelovi se pripremaju bez dodatka spoja. Tako priređeni gelovi ostave se preko noći za stabilizaciju. U bočice s gelovima dodaje se po 1,2 mL 0,1 mol dm⁻³ fosfatnog pufera Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (pH 7,4), koji se prethodno sonificira 30 minuta na ultrazvučnoj kupelji kako bi se uklonili mjehurići zraka. Tijekom 83 sata mjeri se apsorbancija 600 μL prihvatnog medija UV-Vis spektrofotometrom te se zamijeni svježim medijem. Koncentracije otpuštenog lijeka u određenom vremenu računaju se pomoću baždarnog dijagrama spoja. Titracijski podaci su obrađeni u Origin 7.0 programu, korigirani na razrjeđenje.

3.9. Kompleksi ciklodekstrina s aristolohijskom kiselinom i biomolekulama

3.9.1. Karakterizacija derivata aristolohijske kiseline u biorelevantnom mediju

Fluorescentni derivat aristolohijske kiseline (ARifluo) je sintetiziran prema opisanoj proceduri¹⁷⁰. Početne otopine derivata aristolohijske kiseline I (ARI) pripremljene su u DMSO (5 mmol dm^{-3}) zbog slabe topljivosti u vodi, skladištene su na $+4 - +8 \text{ }^{\circ}\text{C}$ te su otopljene u puferu prije mjerenja. UV-Vis spektri snimljeni su na Varian Cary 100 Bio spektrofotometru, fluorescencijski spektri su snimani na Varian Cary Eclipse fluorescencijskom spektrofotometru i CD spektri su snimani na spektrofotometru JASCO J815 na $25,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ koristeći kvarčne kivete ($l = 1 \text{ cm}$) metodom opisanom u poglavlju 3.8.1. Titracijski podaci su obrađeni u Origin 7.0 programu, korigirani na razrjeđenje.

3.9.2. Interakcija aristolohijske kiseline s ciklodekstrinima i goveđim serumom albumina (BSA) i DNA iz telećeg timusa (ct-DNA)

DNA iz telećeg timusa (*Calf thymus-DNA*, ct-DNA) je otopljena u kalcodilatnom puferu, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 7,0. Otopina ct-DNA je dodatno sonificirana na ultrazvučnoj kupelji te filtrirana kroz $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ filter kako bi se dobilo većinom kratki (cca 100 parova baza) štapićasti fragmenti B-helikalne DNA. BSA je otopljen u kalkodilatnom puferu, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 7,0, te je koncentracija određena spektroskopski na NanoDrop spektrofotometru pri 280 nm koristeći njegov molarni apsorpcijski koeficijent $43824 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3 \text{ cm}^{-1}$. Otopine ciklodekstrina pripremljene su u vodi kao početne otopine koncentracije $c = 0,001 \text{ mol dm}^{-3}$, skladištene su na $+4^{\circ} - +8 \text{ }^{\circ}\text{C}$ te razrjeđivane u vodi ili puferu prije mjerenja. Početne otopine BSA i ct-DNA u puferu su priređene i skladištene prema standardnoj proceduri. Fluorimetrijske titracije su provedene dodavajući alikvote početne otopine proteina (u području koncentracija $c(\text{protein}) = 1 - 20 \text{ }\mu\text{mol dm}^{-3}$) u otopinu spoja, snimajući emisijske spektre, uz vrijeme za postizanje termodinamičke ravnoteže od 120 s. Po završetku titracija, fluorescencijski spektri boja/protein kompleksa ostaju konstantni više od 1 h, što potvrđuje postignutu ravnotežu. Titracijski podaci obrađeni su u programu Origin 7.0, korigirani na razrjeđenje (kumulativni dodatak tijekom titracije bio je manji od 5 % početnog volumena) te su prilagođeni prvoj eksponencijalnoj jednadžbi, koja odgovara 1:1 stehiometriji kompleksa spoj/protein. U slučaju titracije ARifluo s ct-DNA, podaci su prilagođeni nelinearnoj regresiji prema McGhee–von Hippelovu formalizmu Scatchardove jednadžbe. U specifičnim slučajevima pojedinih kompleksa titracijski podaci analizirani su Specfit

programom za multivarijantnu analizu^{172,181}. U svim slučajevima uočljivo je dobro podudaranje eksperimentalnih i prilagođenih podataka. Korelacijski koeficijenti su veći od 0,99 za sve izračunate konstante stabilnosti (K_s), uz pogrešku od $\pm 10\%$. Cirkularni dikroizam (CD) sniman je brzinom od 200 nm/min (srednja vrijednost $n = 3$). Pozadinski signal (engl. *background*) je pufer koji je oduzet od svakog spektra. CD eksperimenti su provedeni dodavanjem alikvota početne otopine spoja u otopinu s polinukleotidom ($c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$). Krivulje taljenja za ct-DNA i njegove komplekse sa ispitivanim spojevima određeni su kako je prethodno opisano¹⁸² praćenjem promjene apsorbancije pri 260 nm kao funkcija temperature. Apsorbancija liganada je oduzeta od svake krivulje i rezultati su normalizirani. Temperatura mekšanja (T_m) je središnja točka prijelaznih krivulja određena od maksimuma prve derivacije te provjerena grafički metodom tangente. ΔT_m vrijednosti su izračunate oduzimanjem T_m slobodne nukleinske kiseline od T_m kompleksa. Svaka ΔT_m vrijednost je izražena kao srednja vrijednost najmanje dvaju mjerenja. Pogreška za ΔT_m iznosi $\pm 0.5^\circ\text{C}$.

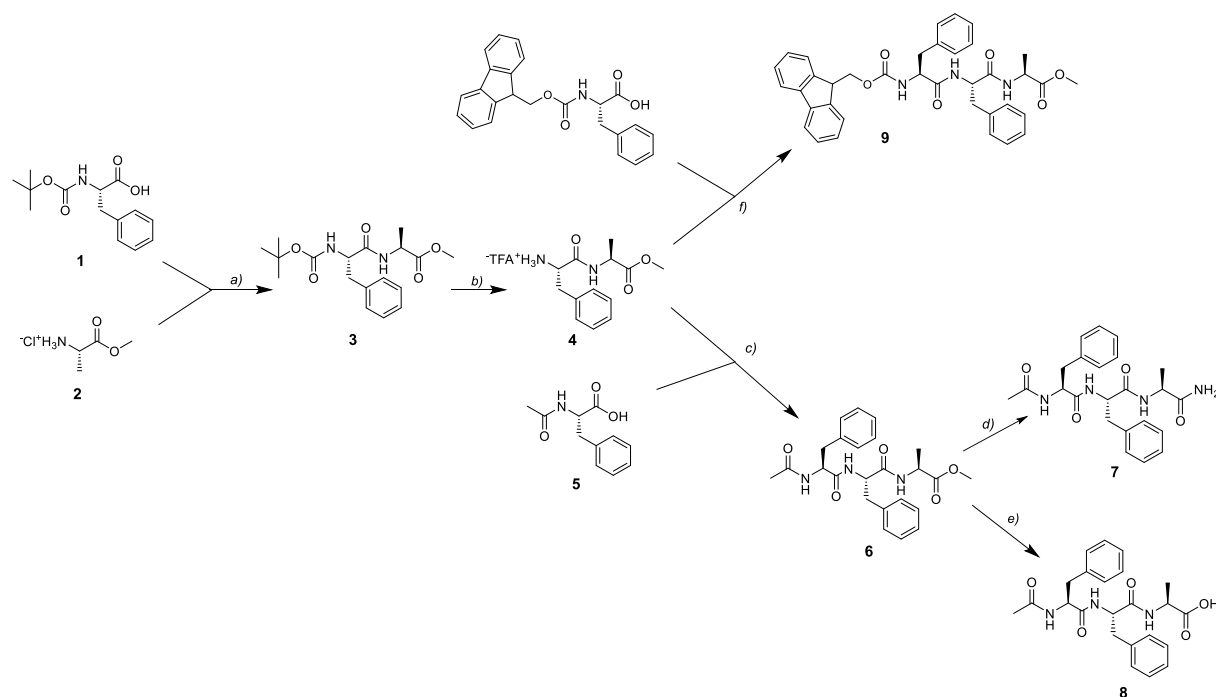
3.9.3. Mjerenja interakcija izotermalnom kalorimetrijskom titracijom (ITC)

Ispitivanje interakcija Vekuronija i ARI sa SMX pomoću uređaja MicroCal VP-ITC mikrokolorimetra provedeno je pri pH 7,0 u $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ fosfatnom puferu. Origin 7.0 program korišten je za analizu podataka. Referentna ćelija napunjena je s čistom Mili-Q vodom. Sve titracije su provedene injektiranjem alikvota vekuronija ($c_0 = 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) iz rotirajuće injekcije (engl. *syringe*) (220 rpm) u izotermalnu ćeliju, koja je u ravnoteži pri $25,0^\circ\text{C}$ te sadrži SMX ili 1:1 SMX/ARI smjesu ($c_0 = 4 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$). Razmak između svakog injektiranja je 360 s, a inicijalna odgoda prije prvog injektiranja je 2000 s. Sve otopine korištene za ITC eksperimente su prethodno degazirane pod sniženim tlakom 15 min. Mikrokolorimetrijski eksperimenti direktno su dali tri parametra: promjenu entalpije reakcije ($\Delta_r H$), konstantu vezanja (K_s) i stehiometriju (N). Vrijednost $\Delta_r G$ izračunata je iz konstante vezanja ($\Delta_r G = -RT \ln K$) a reakcijska promjena entropije je izračunata iz entalpije vezanja i Gibbsove slobodne energije ($\Delta_r S = (\Delta_r H - \Delta_r G)/T$).

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Priprava tripeptidnih derivata

4.1.1. Priprava derivata s aminokiselinskom sekvencom L-Phe-L-Phe-L-Ala

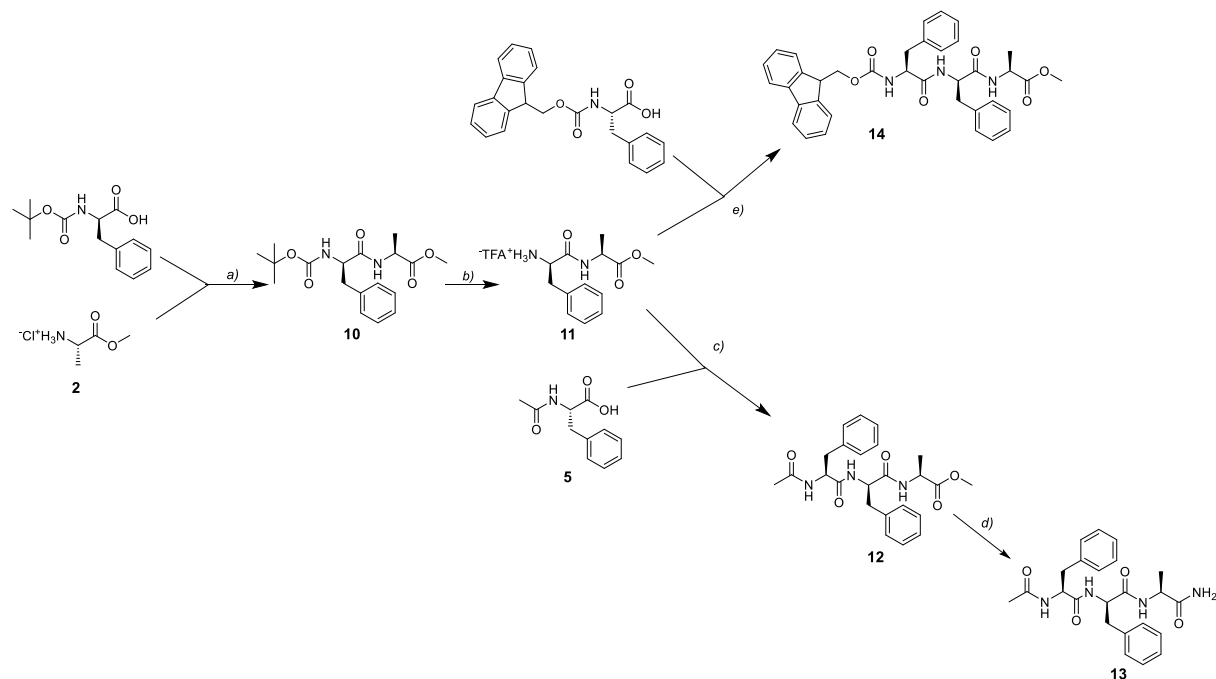


Shema 1. Reagensi i uvjeti: Početne komponente **1**, **2** i **5** priređene su prema opisanim procedurama¹⁷⁶⁻¹⁷⁸. Sinteza produkta **7**, **8** i **9**: (a) DIPEA, CH₂Cl₂, DCC, DMAP, rt, 24 h, 77 %; (b) CH₂Cl₂/TFA, 90 %; (c) EDC, HOBT, DIPEA, CH₂Cl₂, rt, 20 h, 59 %; (d) MeOH/NH₃, 7 dana, 96 %, (e) NaOH, 24 h, 92 %, (f) EDC, HOBT, DIPEA, CH₂Cl₂, rt, 20 h, 27 %.

Sinteza derivata tripeptida s aminokiselinskim slijedom L-Phe-L-Phe-L-Ala (shema 1) započinje sintezom prekursora **1** (Boc-L-Phe-OH) i **2** (L-Ala-OMe × HCl) nakon čega slijedi korak spajanja (*engl. Coupling*) uz pomoć karbodiimidnog reagensa DCC.²² Slijedeći korak uključuje skidanje Boc zaštite s TFA pri čemu se dobiva nezaštićeni N-kraj dipeptida. Acetilni tripeptidni derivat dobiven je daljnjim spajanjem prethodno sintetiziranog spoja **5** na N-kraj dipeptida koristeći EDC. Dobiveni Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-OMe (**6**) u zadnjem stupnju sinteze otopi se u zasićenoj otopini amonijaka u metanolu i reakcijom amonolize dobiven je spoj **7** (Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH₂), dok je hidrolizom estera dobiven spoj Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-OH (**8**) sa slobodnom karboksilnom skupinom. Drugi sintetski put

uključuje vezanje nezaštićenog dipeptida na N-kraju L-Phe-L-Ala-OMe s Fmoc-L-Phe-OH pomoću EDC reagensa čime se dobiva spoj **9** (Fmoc-L-Phe-L-Phe-L-Ala-OMe).

4.1.2. Priprava derivata s aminokiselinskom sekvencom L-Phe-D-Phe-L-Ala



Shema 2. Reagensi i uvjeti: Početne komponente **2** i **5** priređene su prema opisanim procedurama¹⁷⁶⁻¹⁷⁸. Sinteza produkta **13** i **14**: (a) DIPEA, CH₂Cl₂, DCC, DMAP, rt, 24 h, 64 %; (b) CH₂Cl₂/TFA, 100 %; (c) EDC, HOBt, DIPEA, CH₂Cl₂, rt, 20 h, 76 %; (d) MeOH/NH₃, 7 dana, 86 %, (e) EDC, HOBt, DIPEA, CH₂Cl₂, rt, 20 h, 73 %.

Sinteza derivata tripeptida s aminokiselinskim slijedom L-Phe-D-Phe-L-Ala započinje reakcijom vezanja Boc-D-Phe-OH i **2** (L-Ala-OMe × HCl) uz pomoć DCC (shema 2). Zatim slijedi skidanje Boc zaštite trifluorooctenom kiselinom (TFA) kako bi se dobio nezaštićeni N-kraj dipeptida. Acetilni tripeptidni derivat dobiven je daljnjim vezanjem **5** (Ac-L-Phe-OH) na N-kraj dipeptida koristeći EDC. Dobiveni Ac-L-Phe-D-Phe-L-Ala-OMe (**12**) u zadnjem stupnju sinteze otopi se u zasićenoj otopini amonijaka u metanolu i reakcijom amonolize dobiven je spoj **13** (Ac-L-Phe-D-Phe-L-Ala-NH₂). Vezanjem nezaštićenog dipeptida na N-kraju D-Phe-L-Ala-OMe s Fmoc-L-Phe-OH pomoću EDC reagensa dobiva se Fmoc-L-Phe-D-Phe-L-Ala-OMe (**14**).

4.2. Geliranje tripeptidnih derivata

Ispitana su gelirajuća svojstva pripremljenih tripeptidnih derivata u vodi, nekim organskim otapalima i smjesama različitih otapala. Kritična koncentracija geliranja odnosno efikasnost pojedinog gelatora izražena je kao maksimalan volumen ($V_{\max}/\text{mL}$) otapala ili smjese koju može izgelirati 5 mg spoja gelatora (tablica 3 – tablica 6). Nastali gelovi su stabilni kroz nekoliko mjeseci te pokazuju termoreverzibilne sol-gel prijelaze. Novosintetizirani derivati acetiliranih tripeptida različite stereokemije (LLL i LDL) pokazali su se bolji u slučaju geliranja vodenih medija dok su Fmoc- zaštićeni derivati različitih stereokemija (LLL i LDL) pokazali bolju sklonost geliranju alkohola. Acetilni tripeptid **6** se pokazao kao efikasan gelator vode, acetonitrila, etil-acetata i toluena dok se spoj **7** pokazao kao efikasniji gelator vode, polarnih otapala i acetonitrila. Acetilni tripeptid **8** sa slobodnim C krajem pokazao je slaba gelirajuća svojstva vode. Fmoc-zaštićeni tripeptidni derivat **9** pokazao je slabije geliranje s jednostavnim alkoholima i aromatskim spojevima. Acetilni tripeptid **12** se pokazao kao dobar gelator vode, a nešto slabiji gelator acetonitrila i smjesa otapala s vodom dok spoj **13** se pokazao kao slabi gelator vode i acetonitrila. Fmoc-zaštićeni tripeptidni derivat **14** pokazao je geliranje sa jednostavnim alkoholima. Od smjese otapala, spoj **9** gelira smjesu $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$. Navedene smjese u stvari fino podešavaju topljivost gelatora (tablica 4) gdje spojevi uglavnom nisu topljivi u vodi dok su dobro topljivi u DMSO. U različitim smjesama otapala moguće je prirediti sustav u kojem je spoj samo djelomično topljiv što je i sam cilj nastajanja molekulskih samoagregata jer će se pod utjecajem otapala aktivirati samoudruživanje molekula tvorbom nekovalentnih interakcija između molekula.

Tablica 3. Efikasnost geliranja različitih otapala i smjesa otapala izražena kao maksimalni volumen ($V_{\max}$) geliranog otapala s 5 mg pripremljenih derivata tripeptida s aminokiselinskom sekvencom Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala.

Otapalo	$V_{\max}$ / mL		
	6	7	8
H₂O	1,8 opalescentan gel	2,10 opalescentan gel	0,4 opalescentan gel
DMSO	topljivo	topljivo	topljivo
DMSO + H₂O	0,20 (DMSO) + 6,20 (H ₂ O) opalescentan gel	0,40 (DMSO) + 0,70 (H ₂ O) opalescentan gel	topljivo
DMF	topljivo	topljivo	topljivo
MeOH	topljivo	0,60 opalescentan gel	topljivo
MeOH + H₂O	topljivo	0,60 (MeOH) + 1,80 (H ₂ O) opalescentan gel	topljivo
EtOH	topljivo	0,94 proziran gel	topljivo
EtOH + H₂O	topljivo	1,10 (EtOH) + 1,30 (H ₂ O) proziran gel	topljivo
MeCN	1,85 opalescentan gel	3,15 opalescentan gel	topljivo
EtOAc	3,72 opalescentan gel	netopljivo	topljivo
CH₂Cl₂	topljivo	netopljivo	topljivo
Toluen	1,7 proziran gel	netopljivo	topljivo

Tablica 4. Efikasnost geliranja različitih otapala i smjesa otapala izražena kao maksimalni volumen ($V_{\max}$) geliranog otapala s 5 mg pripremljenih derivata tripeptida s aminokiselinskom sekvencom Fmoc-L-Phe-L-Phe-L-Ala.

	$V_{\max}$ / mL
Otapalo	9
H₂O	film
DMSO	topljivo
DMSO + H₂O	0,1 (DMSO) + 0,3 (H ₂ O) film
DMF	topljivo
MeOH	0,7 proziran gel
MeOH + H₂O	0,1 (MeOH) + 0,5 (H ₂ O) opalescentan gel
EtOH	0,3 proziran gel
EtOH + H₂O	0,1 (EtOH) + 0,3 (H ₂ O) opalescentan gel
MeCN	topljivo
EtOAc	topljivo
CH₂Cl₂	netopljivo
Toluen	0,4 proziran gel
<i>tert</i>-butanol	0,2 proziran gel

Tablica 5. Efikasnost geliranja različitih otapala i smjesa otapala izražena kao maksimalni volumen ($V_{\max}$) geliranog otapala s 5 mg pripremljenih derivata tripeptida s aminokiselinskom sekvencom Ac-L-Phe-D-Phe-L-Ala.

Otapalo	$V_{\max}$ / mL	
	12	13
H ₂ O	0,8 opalescentan gel	0,3 opalescentan gel
DMSO	topljivo	topljivo
DMSO + H ₂ O	0,2 (DMSO) + 0,2 (H ₂ O) opalescentan gel	topljivo
DMF	topljivo	topljivo
MeOH	topljivo	topljivo
MeOH + H ₂ O	0,1 (MeOH) + 1,2 (H ₂ O) opalescentan gel	0,1 (MeOH) + 0,4 (H ₂ O) opalescentan gel
EtOH	topljivo	topljivo
EtOH + H ₂ O	0,1 (EtOH) + 0,8 (H ₂ O) opalescentan gel	topljivo
MeCN	topljivo	0,4 opalescentan gel
EtOAc	topljivo	netopljivo
CH ₂ Cl ₂	topljivo	topljivo
Toluen	0,2 proziran gel	netopljivo

Tablica 6. Efikasnost geliranja različitih otapala i smjesa otapala izražena kao maksimalni volumen ($V_{\max}$) geliranog otapala s 5 mg pripremljenih derivata tripeptida s aminokiselinskom sekvencom Fmoc-L-Phe-D-Phe-L-Ala.

	$V_{\max}$ / mL
Otapalo	14
H₂O	0,3 opalescentan gel
DMSO	topljivo
DMSO + H₂O	topljivo
DMF	topljivo
MeOH	0,6 proziran gel
MeOH + H₂O	0,1 (MeOH) + 0,5 (H ₂ O) opalescentan gel
EtOH	0,4 proziran gel
EtOH + H₂O	0,1 (EtOH) + 0,5 (H ₂ O) opalescentan gel
MeCN	0,4 proziran gel
EtOAc	topljivo
CH₂Cl₂	topljivo
Toluen	topljivo
tert-butanol	topljivo

4.2.1. Geliranje Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH₂ u ovisnosti o pH

Utjecaj pH na geliranje ispitan je s gelatorom Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH₂ (Ac-FFA-NH₂) koji je uzet u daljnje ispitivanje kompozitnih gelova. Gelator je pokazao dobra svojstva geliranja u fosfatnom puferu pH 5,6 i 7 dok u bazičnom pH 8 se javljao talog (slika 23, tablica 7).



Slika 23. Utjecaj pH na geliranje peptida Ac-FFA-NH₂; s lijeva na desno pH 5, 6, 7, 8.

Tablica 7. Efikasnost geliranja pri različitim pH izražena kao maksimalni volumen ($V_{\max}$) geliranog otapala s 5 mg gelatora Ac-FFA-NH₂.

pH	$V_{\max}$ / mL
5,8	1,5 opalescentan gel
6,4	1,5 opalescentan gel
7,0	1,5 opalescentan gel
7,4	1,4 opalescentan gel
8,0	0,9 opalescentan gel s talogom, raspada se stajanjem

4.2.2. Geliranje Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH₂ gela s liposomima i proteinom

Određena je efikasnost geliranja gelatora Ac-FFA-NH₂ s liposomima i proteinom gdje je uočeno da pri svim omjerima u kojima je gelator u suvišku dolazi do geliranja i stvaranja opalescentnog gela (tablica 8). Pri jednakim omjerima gelatora i liposoma više nije primijećeno geliranje zbog onemogućavanja nastajanje vodikovih veza i π - π interakcija. Prilikom geliranja

peptida Ac-FFA-NH₂ uz prisutnost proteina BSA čvrsti opalescentan gel nastaje sve do 165 µg BSA po mg gelatora (tablica 9).

Tablica 8. Vrijednosti kritične koncentracije geliranja Ac-FFA-NH₂ u vodi uz prisutnost liposoma

m (Ac-FFA-NH ₂)/mg	Količina dodanog liposoma (mg/mg gelator)	V (H ₂ O)/mL	Molarni omjer liposom:gelator	Opazanje
3,60	0,27	1,2	1:10	opalescentan gel
3,00	0,55	1,0	1:5	opalescentan gel
2,90	1,09	1,0	1:2,5	opalescentan gel
3,00	2,73	0,9	1:1	ne gelira

Tablica 9. Vrijednosti kritične koncentracije geliranja Ac-FFA-NH₂ u vodi uz prisutnost proteina BSA

m (Ac-FFA-NH ₂)/mg	Količina dodanog BSA (µg/mg gelator)	V (H ₂ O)/mL	V (BSA 3 mg mL ⁻¹) / (µL)	Opazanje
2,00	15	0,5	10	opalescentan gel
2,18	28	0,5	20	opalescentan gel
2,59	35	0,7	30	opalescentan gel
2,00	150	0,5	100	opalescentan gel
2,00	165	0,5	110	ne gelira

4.2.3. Geliranje hidrogela Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH₂ s doksorubicinom i nanoformulacijama doksorubicina

Ispitano je geliranje peptida Ac-FFA-NH₂ uz dodatak malih molekula antitumorskog lijeka DOX i nanoformulacija DOX: DOX u liposomima (Myocet) i DOX u PLGA nanočesticama (PLGA-Dox). Ispitan je kapacitet gelatora prilikom ugrađivanja lijeka, DOX. Gelator (0,4 % (w/v)) pokazao je najbolje geliranje pri manjim koncentracijama DOX (tablica 10). To se može pripisati slaboj lipofilnosti DOX koji ometa stvaranje π - π interakcija i time onemogućuje formiranje čvrstog gela pri većim vrijednostima od 20,0 μ g DOX po mg gelatora. Iz rezultata geliranja za DOX u liposomima (tablica 11) vidljivo je da gel nastaje pri vrijednostima do 476 μ g DOX u liposomima po mg gelatora (slika 24). Pokazano je i kako dodatkom PLGA-Dox u vrijednostima do 18,1 μ g po mg gelatora nastaje gel (tablica 12, slika 24). Iz priloženih rezultata, u usporedbi s praznim liposomima, vidljivo je da gelator ima značajno manju sposobnost geliranja DOX i nanoformulacija DOX.

Tablica 10. Efikasnost geliranja pri različitim koncentracijama doksorubicina izražena kao maksimalni volumen ($V_{\max}$) geliranog otapala s 2 mg gelatora Ac-FFA-NH₂.

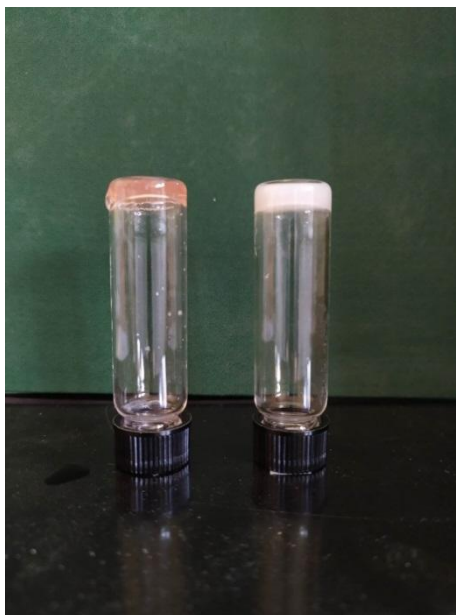
m (Ac-FFA-NH ₂)/mg	Količina dodanog DOX (μ g/mg gelator)	V (H ₂ O)/mL	V (DOX 2 mg mL ⁻¹) / (μ L)	Opažanje
2,2	9,1	0,490	10	opalescentan svijetlo crveni gel
2,0	20,0	0,480	20	ne gelira
2,1	28,6	0,470	30	ne gelira
2,0	50,0	0,450	50	ne gelira
2,2	90,9	0,400	100	ne gelira

Tablica 11. Efikasnost geliranja pri različitim koncentracijama doksorubicina izražena kao maksimalni volumen ($V_{\max}$) geliranog otapala s 2 mg gelatora Ac-FFA-NH₂.

m (Ac-FFA-NH ₂)/mg	Količina dodanog Myocet (μg /mg gelator)	V (H ₂ O)/mL	V (Myocet 50 mg mL ⁻¹) / (μL)	Opažanje
2,0	250	0,490	10	opalescentan gel
2,0	375	0,485	15	opalescentan gel
2,1	476	0,470	20	ne gelira

Tablica 12. Efikasnost geliranja pri različitim koncentracijama PLGA-Dox izražena kao maksimalni volumen ($V_{\max}$) geliranog otapala s 2 mg gelatora Ac-FFA-NH₂.

m (Ac-FFA-NH ₂)/mg	Količina dodanog PLGA-Dox (μg/mg gelator)	V (H ₂ O)/mL	V (PLGA-Dox 1,9 mg mL ⁻¹) / (μL)	Opažanje
2,2	8,6	0,490	10	opalescentan gel
2,0	14,3	0,485	15	opalescentan gel
2,1	18,1	0,480	20	ne gelira
2,0	28,5	0,470	30	ne gelira
2,1	45,2	0,450	50	ne gelira
2,0	95	0,400	100	ne gelira



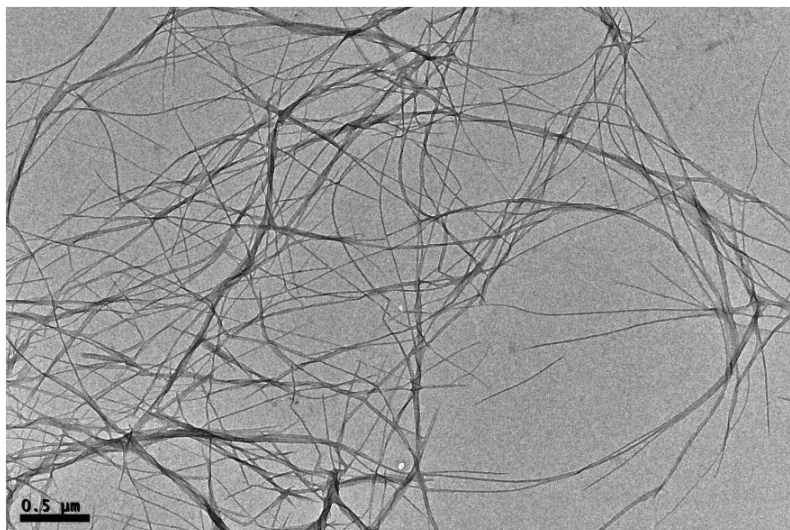
Slika 24. Ac-FFA-NH₂ hidrogel s PLGA-Dox ($c = 6,89 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) (lijevo) i Myocet ($c = 6,89 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) (desno) u 1 mL vode.

4.3. Morfološka karakterizacija derivata tripeptida TEM mikroskopijom

Transmisijska elektronska mikroskopija (TEM) je metoda kojom se ispituje morfologija nanomaterijala. TEM mikroskopi koriste snop elektrona valne duljine 10^5 puta manje od valne duljine svjetla te im je povećanje znatno veće od svjetlosnog mikroskopa. TEM slika se generira pomoću elektrona koji prolaze kroz uzorak. Obzirom da organski spojevi slabo zaustavljaju ili otklanjaju elektrone, uzorci se kontrastiraju s pWk (kalijevom soli polivolfrafske kiseline) ili sjenčaju s paladijem ili platinom. TEM-om se može postići razlučenje do 0.1 nm i povećanje do 10^6 . Gelska mreža može se sastojati od niti, traka, tubula ali ponekad je i vezikularne strukture. Niti ili trake mogu biti ravne ili uvinute, isprepletene, ali mogu biti i račvaste dok najčešće su širine od 10 do 100 nanometara. Morfologija mreže ima utjecaj na čvrstoću i stabilnost gela, a uvjetovana je najviše strukturom gelatora te utjecajem otapala na njegovu samoorganizaciju. Također, promjene mogu nastati pod utjecajem vanjskih čimbenika poput starosti gela, brzine ili temperature hlađenja, koncentracije ili dodataka aditiva.

Obzirom na potencijalnu biološku primjenu tripeptidnih derivata naglasak je bio na ispitivanju jednostavnijih otapala (voda, metanol, etanol, acetonitril i dr.), dostupnijih te potencijalno upotreba manje toksičnih otapala. Metilni ester **6** je lipofilniji gelator od amidnog

derivata 7 jer je vidljivo iz tablice (tablica 3) da gelira nepolarna otapala poput etil-acetata i toluena. Uočeno je da **6** gelira manji volumen vode, no stabilnost gela nije narušena. TEM mikroskopijom uočeno je da spoj **6** ima drugačiju morfologiju gelskih niti u vodi za razliku od amidnog derivata 7. Spoj **6** kao hidrogel ima niti tanke i isprepletene promjera ~5-25 nm (slika 25) dok spoj 7 pokazuje gušće isprepletene niti i trake promjera ~5-50 nm (slika 26).



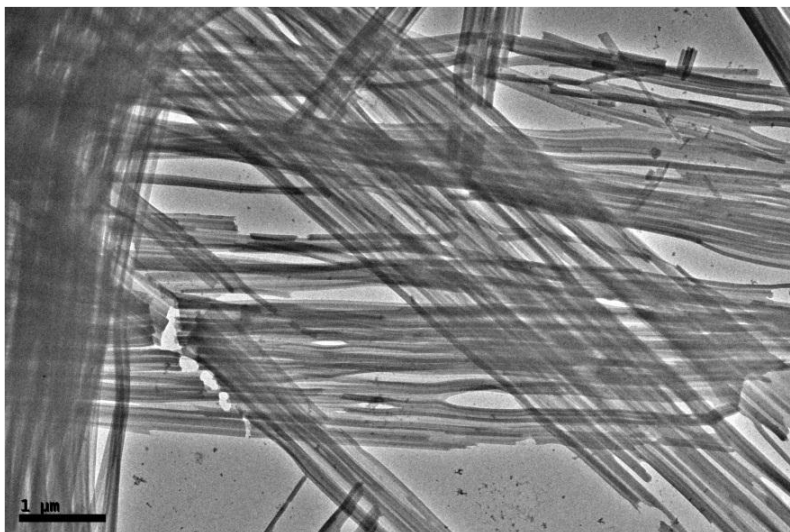
Slika 25. TEM gela **6** u H₂O (sjenčano s Pt).



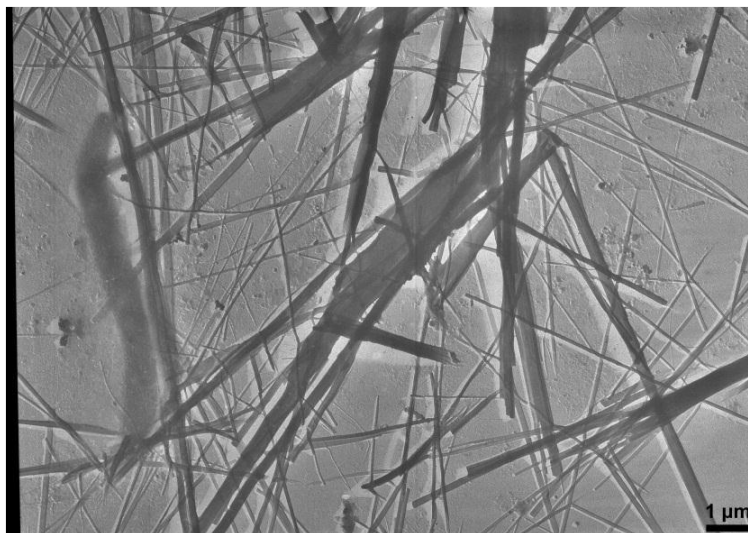
Slika 26. TEM gela **7** u H₂O.

Na morfologiju gela utječe otapalo što je TEM mikroskopija pokazala. Spoj **6** pokazao je u acetonitrilu mrežu višeslojevitih ravnih slijepljenih niti promjera ~30-50 nm (slika 27). Spoj **7** u acetonitrilu pokazao je promjene u strukturi gdje su niti postale ravnog

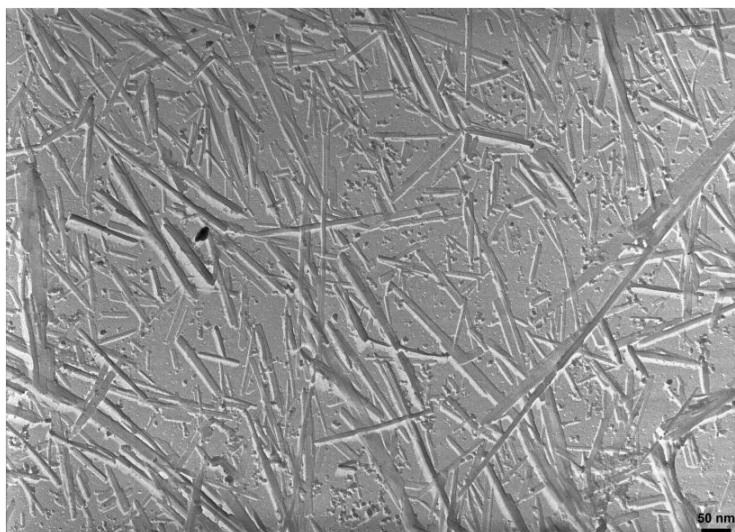
štapčastog oblika promjera ~60-200 nm (slika 28). Spoj 7 u metanolu stvara ravne štapčaste strukture malih promjera ~10-30 nm (slika 29) dok njegova gelirajuća svojstva u etanolu pokazala su promjenu morfologije u tanke niti malih promjera od ~15 nm (slika 30). Iz priloženog moguće je uočiti da spoj 7 povećanjem polarnosti otapala daje fleksibilnije niti manjeg promjera.



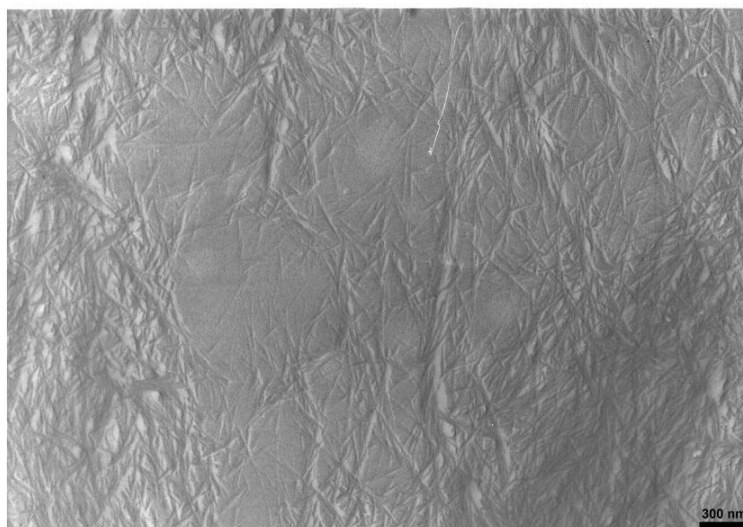
Slika 27. TEM gela 6 u acetonitrilu (sjenčano s Pwk).



Slika 28. TEM gela 7 u acetonitrilu (sjenčano s Pd).

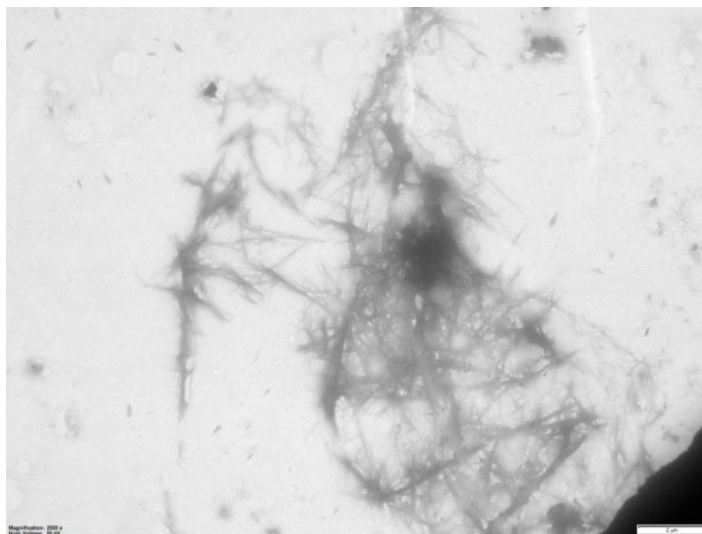


Slika 29. TEM gela **7** u metanolu (sjenčano s Pd).

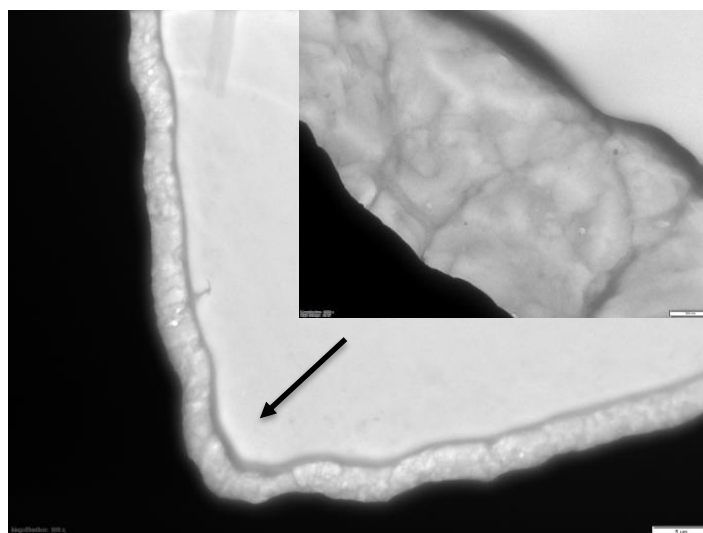


Slika 30. TEM gela **7** u etanolu (sjenčano s Pd).

Za razliku od tripeptida **6** i **7** koji su pokazali raznolika gelirajuća svojstva, izomeri LDL acetilnih derivata tripeptida su slabiji gelatori te su prikazani samo gelovi dobiveni u vodi za spoj **12** (slika 31) i acetonitrilu za spoj **13** (slika 32). Vidljivo je da acetilni derivati tripeptida LDL konfiguracije također daju tanke gusto isprepletene niti .

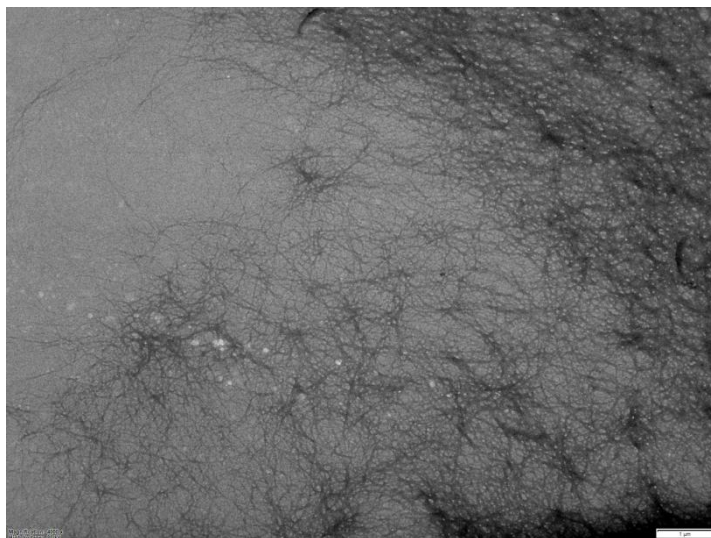


Slika 31. TEM gela **12** u H₂O.

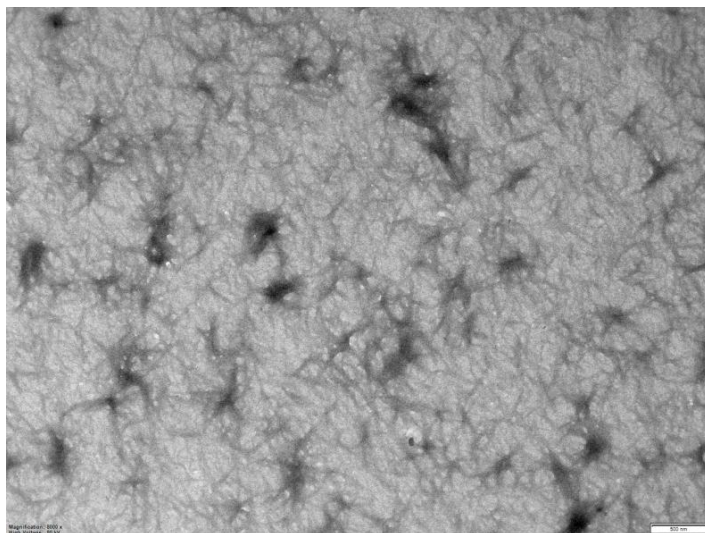


Slika 32. TEM gela **13** u acetonitrilu.

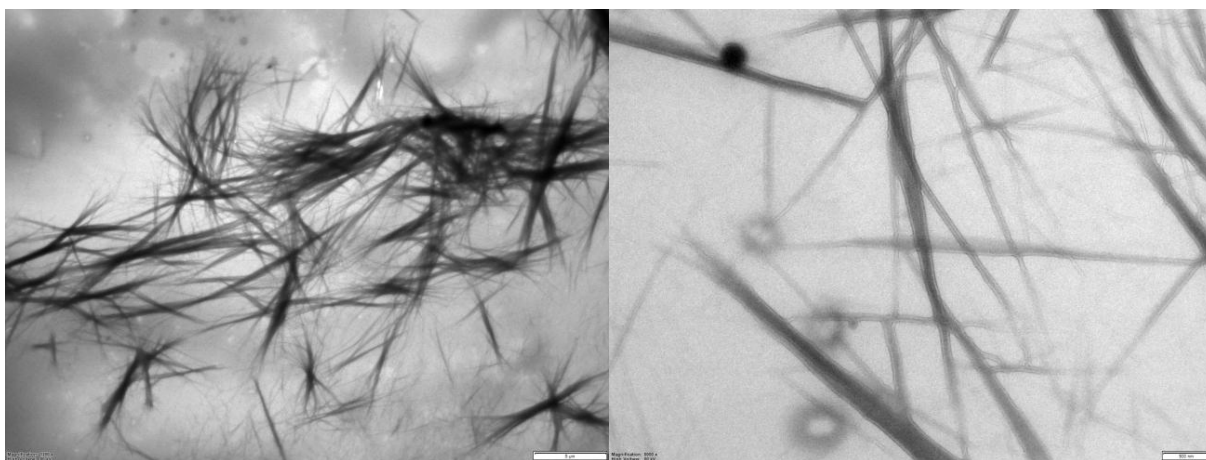
Fmoc zaštićeni derivati LLL i LDL konfiguracije tripeptidnih derivata pokazali su dobra gelirajuća svojstva s jednostavnim alkoholima, gdje su najbolje gelirali metanol i etanol. TEM mikroskopijom utvrđeno je da LLL izomer **9** gelira u obliku tankih niti promjera ~5-20 nm u metanolu (slika 33). U etanolu LLL derivat **9** gelira niti gušćeg i manjeg promjera (slika 34) dok LDL derivat **14** gelira u obliku niti promjera ~10-350 nm (slika 35). Gel nastao u acetonitrilu za spoj **14** pokazao je također gustu mrežu niti malog promjera od ~5-10 nm dok spoj **9** ne gelira acetonitril (slika 36).



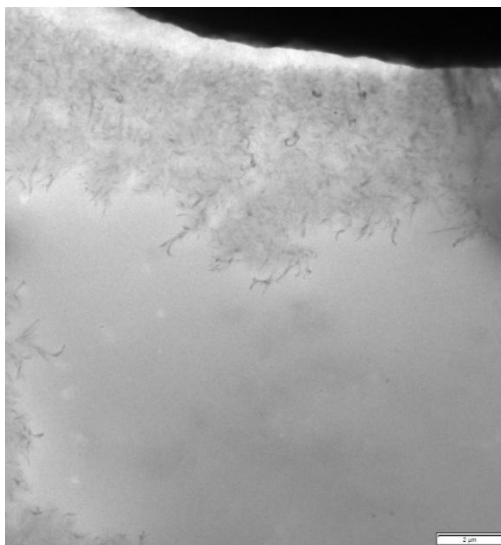
Slika 33. TEM gela **9** u metanolu.



Slika 34. TEM gela **9** u etanolu.



Slika 35. TEM gela **14** u etanolu.



Slika 36. TEM gela **14** u acetonitrilu.

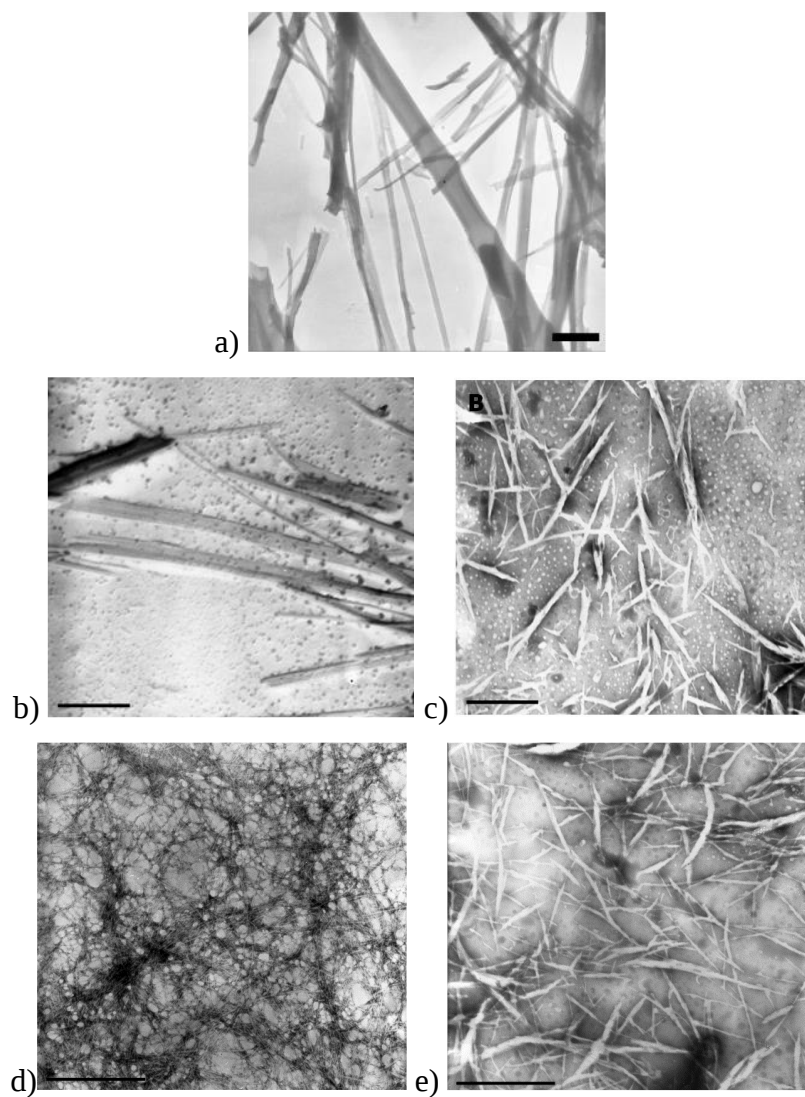
Zamijećeno je da acetilni derivati daju nešto veće i rjeđe niti usporedno s Fmoc derivatima tripeptida što se može pripisati Fmoc zaštitnoj skupini koja zbog svoje aromatske strukture može sudjelovati u π - π interakcijama čime dodatno povezuje niti u gušću mrežu.

4.4. Ispitivanje utjecaja liposoma i proteina FITC-BSA na gelirajuća svojstva hidrogelatora

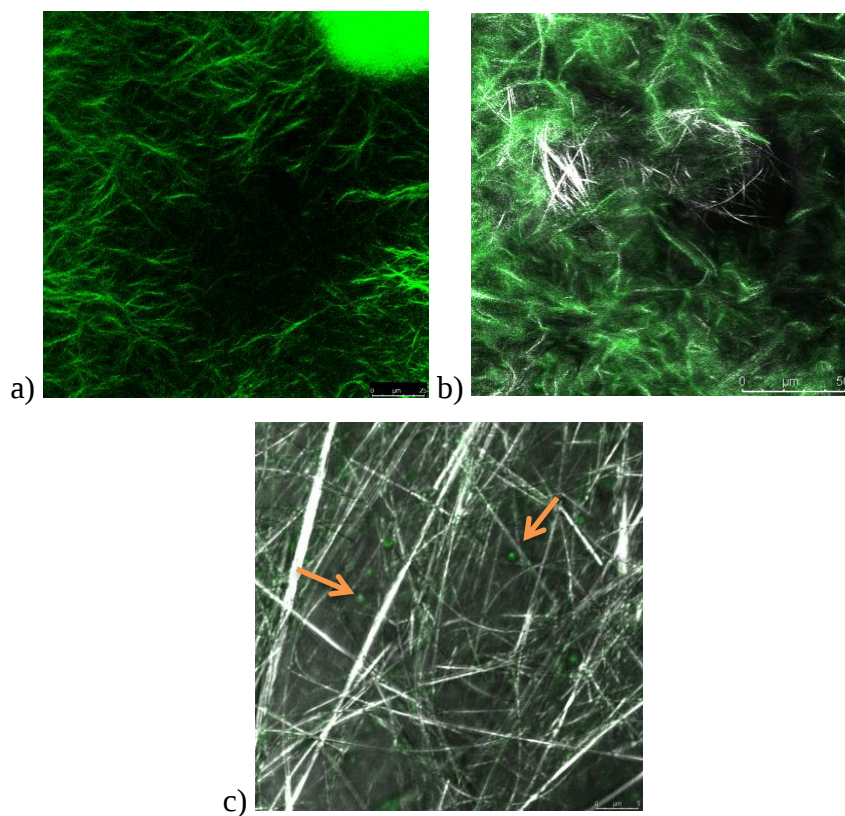
4.4.1. Morfološka karakterizacija hidrogela s liposomima i proteinima

Morfologija kompozitnih hidrogelova analizirana je TEM, konfokalnim fluorescencijskim mikroskopom te AFM. Peptidni gelovi su priređeni u 0,4 % w/v prema uputama iz poglavlja 3.4.4. i 3.5. Formiranje vlakana hidrogela Ac-FFA-NH₂ vizualizirano je bez sjenčanja te pWk sjenčanom ili Pd sjenčanom TEM metodom. Uočen je nepromijenjeni strukturalni integritet gela kao i varijacije u debljini niti kod hidrogela s liposomima (slika 37a,b,c) te je vidljivo da su liposomi smješteni između niti hidrogela. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da nastaje gelska izdužena nitasta mreža koja je kod dodatka BSA gušća te su niti manjeg promjera u odnosu na sam gel (slika 37d) dok hidrogel s liposomskom formulacijom BSA ima sličnu strukturu čistog gela u koncentracijama manjim od koncentracije Ac-FFA-NH₂ (slika 37e). Konfokalna mikroskopija omogućila je vizualizaciju fluorescentno obilježenog proteina FITC-BSA u liposomima i u liposomima ugrađenim u hidrogel. Mikrografija proteina ugrađenog u hidrogel prikazuje fluorescirajuću gelsku mrežu, tj. fluorescentni protein koji se nalazi u puferu u kojem su nastale gelske niti (slika 38a). Kada je protein ugrađen u liposome, vidljivo je da se on nalazi u liposomima ili agregirajućim nakupinama liposoma (slika 38b). AFM mikroskopijom mjeri

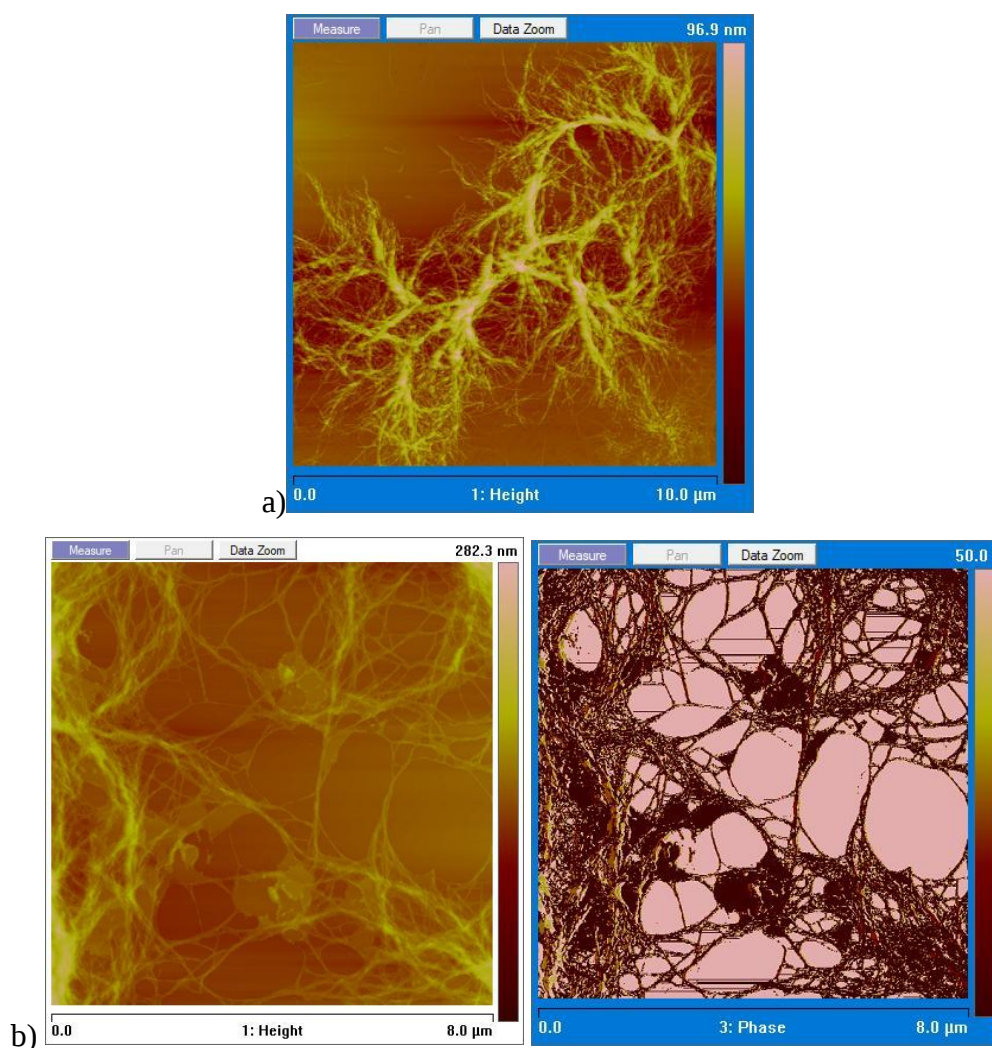
se interakcija između površine i vrlo oštrog šiljka koji je na savitljivoj poluzi. Na taj način se mapira željena površina, a zbog nedestruktivnosti metode može se raditi u prirodnoj formi materijala bez primjerice sjenčanja uzorka kao kod TEM-a. AFM mikroskopijom potvrđeno je da nastaju tanke niti hidrogelatora Ac-FFA-NH₂. Također, vidljive su smeđe nakupine liposoma koje se nalaze između niti hidrogelatora. TEM mikroskopija, konfokalna mikroskopija i AFM dale su podatke o strukturi kompozitnog gela potvrdile samoudruživanje peptida u hidrogel u prisutnosti liposoma, BSA te liposomskih BSA formulacija u opisanim eksperimentalnim uvjetima (slika 37-slika 39).



Slika 37. TEM mikrograf hidrogela (a) 0,4 % w/v Ac-FFA-NH₂ u vodi, pWk sjenčano, (b) s liposomima 5:1 molarni omjer, Pd sjenčano, (c) s liposomomima 5:1 omjer, pWk sjenčano; povećanje 8000x. Skala = 1 µm. (d) s BSA; (e) s liposomskom BSA formulacijom; pWk sjenačno; povećanje 16000x. Skala = 1 µm.



Slika 38. Konfokalna fluorescentna mikroskopija kompozita hidrogela 0,4 % w/v Ac-FFA-NH₂ u vodi: A) s tioflavin T-om, skala = 25 μm; B) s FITC-BSA, skala = 50 μm; C) s liposomskom FITC-BSA formulacijom, skala = 5 μm (strelicama označene liposomske formulacije).



Slika 39. AFM hidrogela (a) 0,4 % w/v Ac-FFA-NH₂ u vodi, (b) s liposomima 1:5 molarni omjer (roza boja – tinjac, smeđe-zeleno – hidrogel niti, tamno-smeđe – liposomi).

4.4.2. Dinamičko raspršenje svjetla (DLS)

Analiza veličine liposoma metodom DLS pokazala je postojanje sferičnih multilamelarnih liposomskih formulacija s većinskim promjerom od 530 nm (± 120 nm). Liposomi s ugrađenom BSA bili su očekivano veći od 800 nm (± 60 nm) (tablica 13). DPPC i DMPC liposomi uzeti su kao modelne strukture i korištene su u svrhu ispitivanja interakcija s peptidnim hidrogelatorom. Veličina DPPC liposoma bila je 29 nm (± 12 nm) i 60 nm (± 26 nm) za DMPC (tablica 14).

Tablica 13. Veličina i zeta potencijal liposoma u liposomskim formulacijama

Uzorak	Veličina/nm	Zeta potencijal/mV
Prazni liposomi	530 ± 100	$-0,1 \pm 0,5$
Liposomi s BSA	820 ± 60	$-1,0 \pm 0,6$

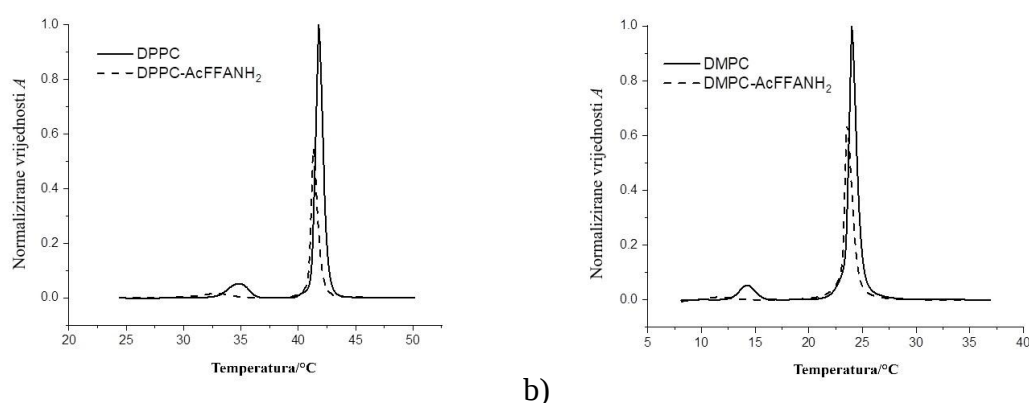
Tablica 14. Veličina i zeta potencijal DPPC i DMPC liposoma pripremljenih za DSC mjerenja

Uzorak	Veličina/nm	Zeta potencijal/mV
DPPC	30 ± 10	$1,9 \pm 0,5$
DMPC	60 ± 26	$-2,5 \pm 1,5$

4.4.3. Ispitivanje interakcije hidrogela i liposoma metodom DSC

Osnovni prijelaz fosfolipidnog dvosloja, kad se povećava temperatura, opisuje prijelaz između uređenog dvosloja u tekuće stanje (neuređenu strukturu). Promjena u osnovnom prijelazu dvosloja je posljedica utjecaja temperature na van der Waalsove interakcije između ugljikovodičnih lanaca, čime se povećava njihova mobilnost. Količina energije koja je upotrebljena se povezuje s faznim prijelazom fosfolipida i konformacijom fosfolipida što utječe na stabilnost sustava. Nekovalentne interakcije između peptidnih molekula uzrokuju samoudruživanje i time stvaranje hidrogelova. Interakcija s fosfolipidnim molekulama u liposomima mogu utjecati i na strukturu fosfolipidnog dvosloja i na formiranje hidrogela.²¹ DSC je neinvazivna tehnika za ispitivanje membranskih faznih prijelaza kako bi se okarakterizirale fazne promjene koje odgovaraju prijelazima sustava iz faze gela u tekuću (T_m). Omogućuje kvantitativni uvid u utjecaj molekula peptida hidrogelatora na membransku strukturu i obratno. Interakcija peptida s lipidima može utjecati na razna lipidna svojstva poput načina slaganja, membranske fluidnosti i kooperativnosti faznih prijelaza. Najčešće, pretprijelazna (engl. *pretransition*) faza je vrlo osjetljiva na molekule koje stupaju u interakciju s polarnim grupama fosfolipidnih molekula i često nestaje dodatkom drugih molekula. Glavni prijelaz (engl. *main transition*) ukazuje na interakcije na dubljoj razini u području nepolarnih lanaca masnih kiselina.¹⁸³ Ispitani su fazni prijelazi multilamelarnih liposoma DPPC (veličina liposoma 29 nm (± 12 nm)) i DMPC (veličina liposoma 60 nm (± 26 nm)) u odsutnosti i prisutnosti gelatora Ac-FFA-NH₂. DMPC (14:0) pokazuje dva endotermna prijelaza: oštar glavni prijelaz pri $T_m = 24$ °C i širok pretprijelaz pri $T_{p1/2} = 11\text{--}15$ °C. DPPC (16:0) ima glavni prijelaz na $T_m = 41$ °C i pretprijelaz na $T_{p1/2} = 35$ °C. Iz DSC termograma mogu se očitati tri

ključna parametra: entalpija prijelaza (ΔH) (proporcionalna području ispod prijelaznog signala koja reflektira jačinu van der Waalsovih sila između lanaca masnih kiselina lipida. Nadalje, cijela širina na pola maksimuma ($\Delta T_{1/2}$) koja se veže s kooperativnosti u prijelazu, vezanom uz broj molekula koje simultano sudjeluju u prijelazu. Prijelazne temperatura (T_p , T_m , T_h) vežu se uz pretprijelaz, glavni prijelaz i druge endotermne procese.^{184,185} Rezultati (slika 40) pokazali su da dodatak Ac-FFA-NH₂ u liposomsku suspenziju utječe na lipidni dvosloj na nekoliko načina. Može se uočiti mali pomak i širenje pika glavnog prijelaza fosfolipida, kao i nestajanje pretprijelazne faze. Oba područja prijelaza zahtijevaju manje energije (ΔH) kako bi se inicirala namreškana (engl. *Ripple*) i tekuća faza (tablica 15). Može se pretpostaviti da interakcije između gelatora Ac-FFA-NH₂ i lipidnih molekula destabiliziraju sekundarnu strukturu, što odgovara modelu koji su predložili Žinić i suradnici.¹⁸⁶ Žinić i suradnici predložili su model koji uključuje vodikove veze koje primarno uzrokuju samo-udruživanje hidrogelatora. Ac-FFA-NH₂ formira jake vodikove veze koje tvore slojevit strukturu s hidrofobnim aromatskim fenilalaninskim skupinama okrenutim prema fosfolipidnom dvosloju čime se objašnjava njihova interakcija.



Slika 40. a) DSC termogram DPPC i Ac-FFA-NH₂ :DPPC u omjeru 2,5:1. b) DSC termogram DMPC i Ac-FFA-NH₂ :DMPC u omjeru 2,5:1 (sve vrijednosti su korigirane oduzimanjem bazne linije).

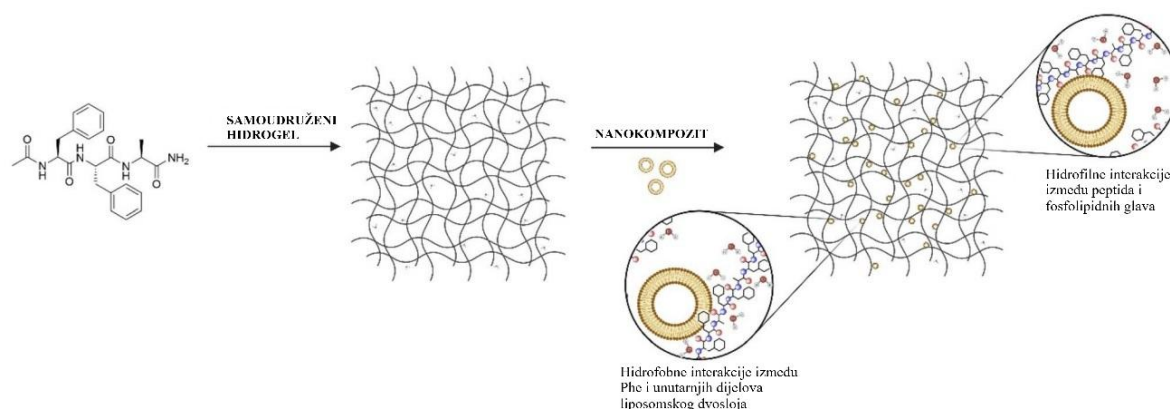
Tablica 15. Termalne karakteristike liposoma i liposomskih kompozita s Ac-FFA-NH₂ peptidnim hidrogelatorom, iz DSC mjernih podataka.

Uzorak	$T_p^*/^{\circ}\text{C}$	$\Delta H/\text{kJ mol}^{-1}$	$T_m^{**}/^{\circ}\text{C}$	$\Delta H/\text{kJ mol}^{-1}$
DPPC	34,93	2,92	41,78	22,40
Ac-FFA-NH ₂ :DPPC	32,98	1,38	41,33	11,72
DMPC	14,33	2,47	24,00	27,33
Ac-FFA-NH ₂ :DMPC	11,65	0,624	23,57	18,55

*Temperatura (T_m) – temperatura mekšanja; temperatura prijelaza gela u fluid stanje

**Temperatura (T_p) – temperatura pretprijelaza

Rezultati su pokazali vidljive promjene u utjecaju peptidnog hidrogelatora na pomake i proširenja glavnog prijelaza DPPC ili DMPC liposomskog dvojsloja kao i na entalpiju glavnog prijelaza (ΔH). ΔH je značajno manja za glavni prijelaz kod DPPC uz prisutnost peptida u usporedbi s DMPC. Ukupna termodinamička destabilizacija DPPC dvosloja je primjetna, pokazujući dvostruko manju entalpiju pretprijelaza i glavnog prijelaza. Dobiveni rezultati ukazuju na snažnije interakcije peptida Ac-FFA-NH₂ s unutaršnjim dijelom dvosloja DPPC liposoma u odnosu na DMPC liposome. DPPC i DMPC su dvoionski (zwitterionski) lipidi, a jedina razlika između njih je duljina lanca masne kiseline. Opaženi učinak vjerojatno je posljedica razlika u pakiranju fosfolipidnih molekula u dvosloju, koje proizlaze iz duljine lanca masne kiseline i jačih hidrofobnih interakcija s hidrofobnim fenilalaninom. Jača hidrofobna interakcija peptida s DPPC također se može objasniti činjenicom da je DPPC dvosloj liposoma više dehidriran i, prema tome, hidrofobniji zbog više temperature faznog prijelaza (42 °C) u usporedbi s onom od DMPC (23 °C).¹⁸⁷ S druge strane, interakcije peptida s površinom membrane popraćene su deformacijama u okolnom lipidnom dvosloju i utječu na pakiranje lipida i prodiranje vode u membranu, što bi moglo utjecati na konformacijske promjene membrane i omogućilo interakcije peptida s međufaznim hidrofobnim regijama DPPC dvosloja (slika 41).¹⁸⁸

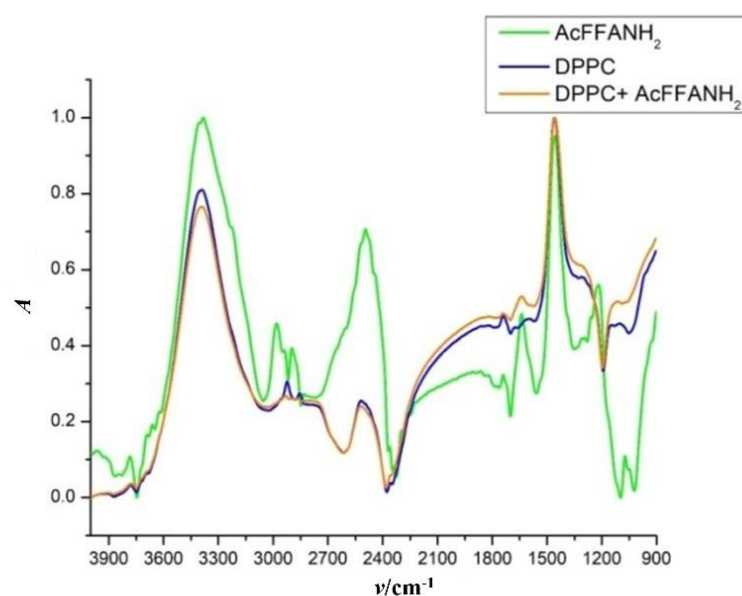


Slika 41. Prikaz predloženih interakcija liposoma i hidrogela Ac-FFA-NH₂.

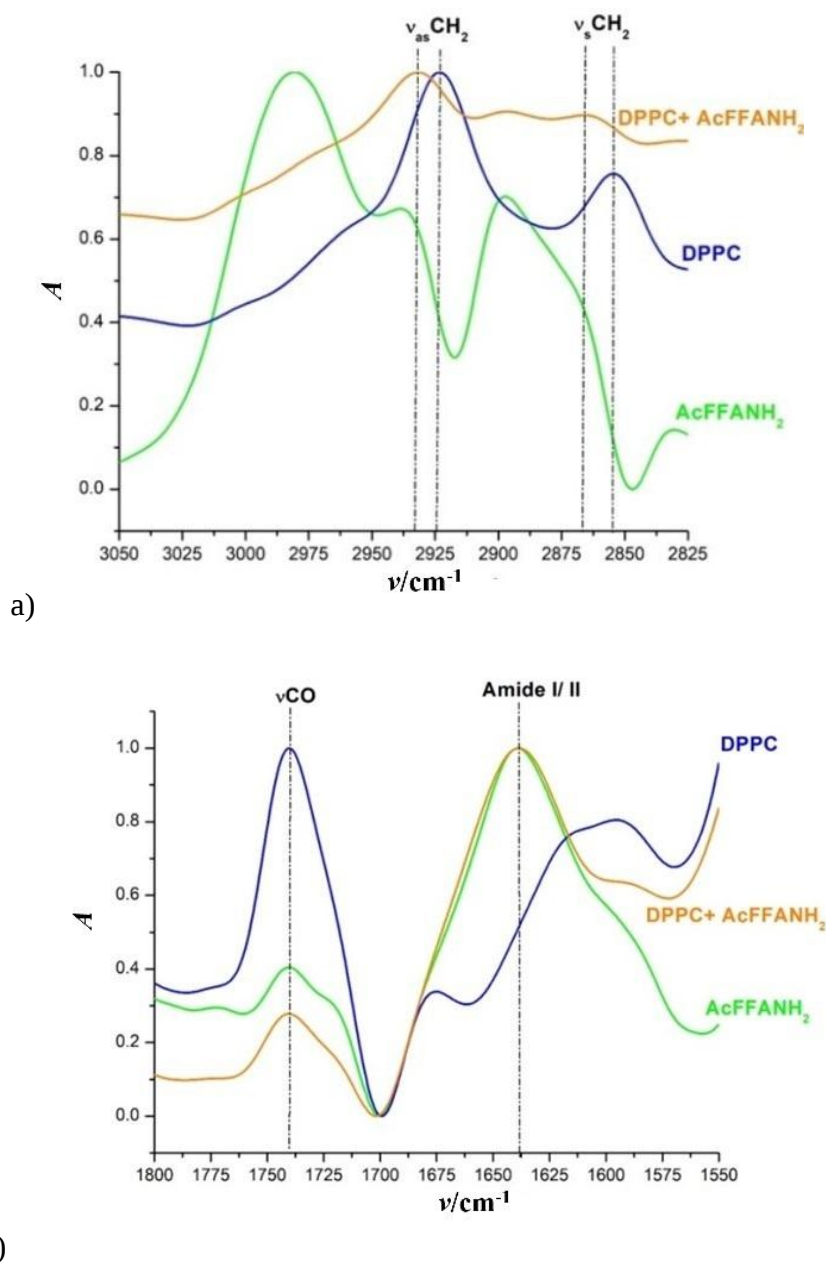
4.4.4. FTIR -ATR karakterizacija interakcije hidrogela i liposoma

Interakcija između fosfolipida u liposomima i peptidnog hidrogelatora Ac-FFA-NH₂ je ispitana pomoću FTIR-ATR. Sve otopine pripremljene su u D₂O zbog intenzivnog apsorpcijskog signala vode pri 3600-3000 cm⁻¹ što otežava detekciju CH₂ simetričnih i asimetričnih sprežanja (3000-2800 cm⁻¹) iz Ac-FFA-NH₂ i lipidnih komponenata. Karakteristični oblik OH/NH područja sprežanja potvrđuje prisutnost hidroksilnih skupina i vodikovih veza usko povezanih sa stupnjem hidratacije materijala odnosno sustava.¹⁸⁹ Nakon mjerenja FTIR spektara suspenzija DPPC, Ac-FFA-NH₂ i DPPC s Ac-FFA-NH₂ suspenzija pri 25 °C, rezultati su obrađeni. Spektar čistog otapala D₂O je zaglađen Savitsky-Golay jednadžbom (polinom 3. stupnja) i oduzet od spektara komponenata (slika 42). Daljnja analiza temeljila se na dijelovima spektara koji sadrži značajne vibracijske vrpce molekula u sustavu: a) 3025–2825 cm⁻¹ (antisimetrično ($\nu_{as}CH_2$) i simetrično (ν_sCH_2) istezanje metilenskih skupina)^{190,191}; b) 1775–1700 cm⁻¹ (istezanje karbonilne skupine (νCO))¹⁹²; c) 1700–1567 cm⁻¹ (amid I: istezanje skupine C=O sekundarnih amida; amid II: deformacija skupine NH₂ primarnih amida)¹⁹³ (slika 43). Analiza vrpce CH₂ istezanja (ν_s i ν_{as}) ukazala je na blagi pomak maksimuma vrpce prema višim valnim brojevima dodatkom Ac-FFA-NH₂ u DPPC suspenziju, kao i promjenu intenziteta. U prisustvu gelatora, maksimum vrpce istezanja CH veza metilenske skupine u spektru DPPC suspenzije pomiče se s 2923 cm⁻¹ na 2931 cm⁻¹ ($\nu_{as}CH_2$) i s 2854 na 2865 cm⁻¹ (ν_sCH_2). Ti su pomaci bili popraćeni promjenama intenziteta vrpce. Takvi pomaci sugeriraju promjene vodikovih veza i moguću zamjenu D–H u suspenziji. U području vrpce amida (1700–1567 cm⁻¹): vrpca amid I pri 1638 cm⁻¹, karakteristična za Ac-FFA-NH₂, također je bila prisutna u smjesi Ac-FFA-NH₂ + DPPC, ali je nije bilo u čistim DPPC uzorcima.

Nepromijenjeni položaj vrha od 1638 cm^{-1} ukazuje da DPPC ne mijenja sekundarnu strukturu Ac-FFA-NH₂. Ovo opažanje sugerira interakciju u kojoj nema razaranja strukture između molekula peptida i lipida u kojoj nema utjecaja DPPC na strukturu gela.¹⁹⁴ U području istezanja karbonilne skupine ($1775\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$), dodavanje Ac-FFA-NH₂ u DPPC rezultiralo je samo promjenama intenziteta vrpce u spektru, što ukazuje na jake interakcije između peptidne i fosfolipidne glavne skupine. Ovakvo ponašanje podudara se s istraživanjima na antimikrobnim peptidima, gdje hidrofobne aminokiseline u peptidima imaju važnu ulogu u poticanju dubljih prodiranja peptida u lipidne membrane.¹⁹⁵ Rezultati FTIR-ATR (slika 43) ukazuju na interakcije između DPPC i Ac-FFA-NH₂ peptida. Pomaci i promjene intenziteta u vibracijskim vrpce metilenske i karbonilne skupine upućuju na promjene slaganja lipida i interakcije između peptida i lipida. Dobiveni rezultati podupiru hipotezu da su liposomi adsorbirani na peptidne fibrile unutar supramolekulskog gela.



Slika 42. Normalizirani FTIR spektri: zeleno (Ac-FFA-NH₂), plavo (DPPC multilamelarni hidrirani s D₂O), narančasto (DPPC+Ac-FFA-NH₂ smjesa).

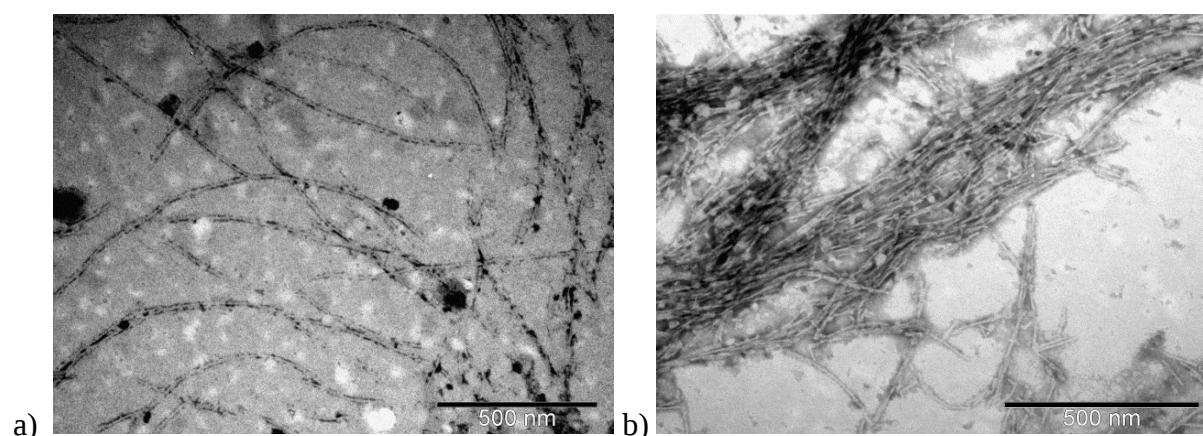


Slika 43. Normalizirani FTIR spektari: a) područje istezanja skupine CH_2 - zeleno (Ac-FFA-NH_2), plavo (DPPC multilamelarni hidratizirani s D_2O), narančasti (DPPC+ Ac-FFA-NH_2 smjesa). b) amid vrpce $\nu\text{C=O}$ i amid I i II – zeleno (Ac-FFA-NH_2), plavo (DPPC multilamelarni hidratizirani s D_2O), narančasti (DPPC+ Ac-FFA-NH_2 smjesa). Vertikalne linije prikazuju maksimum vrpca.

4.5. Karakterizacija kompozitnih formulacija hidrogela Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH₂ s nanoformulacijama doksorubicina

4.5.1. TEM karakterizacija kompozita hidrogela

Formiranje vlakana promatrano je transmisijskim elektronskim mikroskopom. Peptidni gelovi su priređeni u 0,4 % w/v prema uputama iz poglavlja 3.5. Nitasta struktura s manjim promjerom niti od ~10-50 nm uočena je i kod kompozitnih hidrogelova s DOX u liposomima i PLGA-Dox. TEM analizom uočeno je vezanje većinskim dijelom na gelske niti (slika 44).



Slika 44. TEM mikrograf hidrogela (a) 0,4 % w/v Ac-FFA-NH₂ s Myocetom, (b) s PLGA-Dox; pWk sjenčano; povećanje 16000x. Skala = 500 nm.

4.6. *In vivo* testiranje imunostimulirajuće aktivnosti peptidnih hidrogelatora

Nedavne studije istaknule su peptidne nanomaterijale kao obećavajuće sustave za dostavu cjepiva zbog njihove izražene adjuvantne aktivnosti i sposobnosti poticanja specifičnog imunološkog odgovora.³⁰ Stoga je bilo vrijedno ispitati imunostimulacijska svojstva odabranih peptidnih hidrogelova. Istraživanja su provedena u Centru za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji Sveučilišta u Zagrebu, pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Ruže Frkanec.

Specifični cilj ovog ispitivanja bio je *in vivo* ispitati aktivnost peptidnih hidrogelatora fokusirajući se na utjecaj njihovih kemijskih struktura na aktivnost. Kemijska struktura peptidnih hidrogelatora je značajna za njihovu imunostimulacijsku aktivnost. Istraživanja su pokazala da čak i najmanje promjene u slijedu aminokiselina, poput zamjene hidrofobnih ogranka ili modifikacije naboja funkcijskih skupina, može utjecati na imunostimulacijska svojstva peptidnih hidrogelova.³⁰ Ustanovljeno je da promjena sekvence aminokiseline i

položaj hidrofobnih amino skupina ili zamjena neke od aminokiselina značajno smanjuje količinu induciranih protutijela u imuniziranim miševima. Peptidi koji sadrže protonirane amine su pokazali snažniju imunostimulirajuću aktivnost od peptida koji su sadržavali negativno nabijene, deprotonirane karboksilne skupine.^{31,141,196}

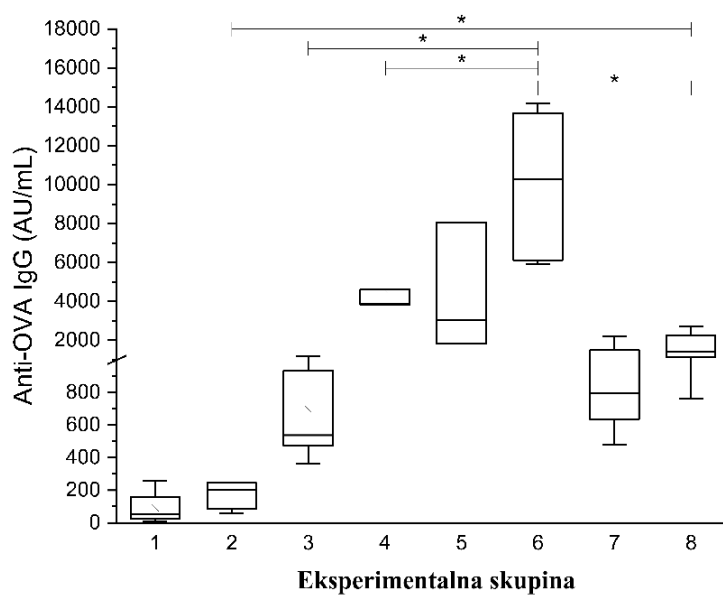
U ovoj disertaciji ispitani su spojevi Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH₂ (**7**, Ac-FFA-NH₂), Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-OH (**8**, Ac-FFA-OH) i Ac-L-Phe-L-Phe-βAla-OMe (Ac-FFβA-OMe) kao adjuvanti koji se razlikuju po N-kraju dok se Ac-FFβA-OMe razlikuje i po zamijenjenom α-alaninu s β-alaninom. Adjuvanti su spojevi koji se dodaju cjepivima radi pojačanja specifičnih imunoreakcija na određeni antigen. Utjecaj hidrogelatora na specifičnu imunsku reakciju određen je mjerenjem količine ukupnih imunoglobulina klase G (IgG) i količine podklasa IgG1 i IgG2a. Za ispitivanje adjuvantske aktivnosti korišten je mišji model (engl. *Murine model of adjuvancity*) s ovalbuminom (OVA) kao modelnim antigenom. Korišten je prethodno razvijeni protokol imunizacije.¹⁹⁷ OVA je antigen slabe imunogenosti te se koristi u skladu s propisanim uputama za ispitivanje adjuvanata.¹⁹⁸ Kako bi se odredila ukupna količina anti-OVA IgG i anti-OVA IgG1 te IgG2 podklasa korišten je prethodno uspostavljen ELISA test (engl. *Enzyme linked immunoassay*). Kvantifikacija je provedena testom paralelnih pravaca te su rezultati statistički obrađeni. Rezultati su izraženi u proizvoljnim jedinicama po mililitru (AU/mL). Uz ispitivane hidrogelatore, ispitani su i komercijalno dostupni adjuvanti s različitim načinima djelovanja. Prethodna istraživanja pokazala su dobre adjuvantske efekte peptidoglikanskog monomera (PGM), adjuvanta bakterijskog porijekla.^{199,200} Imunostimulacijska aktivnost muramil dipeptida (MDP), liposoma i imikvimoda, agonista Toll-like receptora 7/8 (engl. *imiquimod*), je već istražena i detaljno opisana.^{201,202} Ispitivanje aktivnosti novih adjuvanata je dugotrajan proces zbog čega je mali broj adjuvantiranih cjepiva u primjeni kod ljudi.²⁰³ Osnovni zahtjevi kod predkliničkih ispitivanja adjuvanata uključuju karakterizaciju imunološkog odgovora i usporedbu aktivnosti s već poznatim i opisanim adjuvantima. Dobiveni rezultati su pokazali da ispitivani peptidni hidrogelatori izazivaju snažni imunološki odgovor (slika 45). Vidljivo je da je statistički značajnije veća količina ukupnog IgG protutijela razvijena u grupi miševa imuniziranih s OVA inkorporiranim u Ac-FFA-NH₂ hidrogel u usporedbi s drugim ispitanim adjuvantima. Druga dva peptida, Ac-FFA-OH i Ac-FFβA-OMe, strukturno različita, također su inducirala značajno veću količinu ukupnog IgG protutijela u usporedbi sa samim OVA antigenom i OVA antigenom u liposomima ili s PGM.

Za postizanje uvida u tip imunološkog odgovora analizirana je količina specifičnih podgrupa imunoglobulina, IgG1 (Th2-ovisnih) i IgG2a (Th1-ovisnih) protutijela (slika 46a,b). Ac-FFA-NH₂ peptid pokazao je jaku imunostimulacijsku aktivnost, zbog značajnog povećanja proizvodnje IgG1, slično kao MDP, dok je također inducirao značajnu količinu IgG2a protutijela, slično kao imikvimod (slika 46a). Nasuprot tome, Ac-FFβA-OMe i Ac-FFA-OH hidrogelovi pretežno stimuliraju proizvodnju IgG2a, što ukazuje na jači Th1-posredovani odgovor (slika 46b). Polarizacija imunokompetentnih T stanica prema Th1 ili Th2 tipu imunološkog odgovora je važna za ukupan imunološki odgovor.

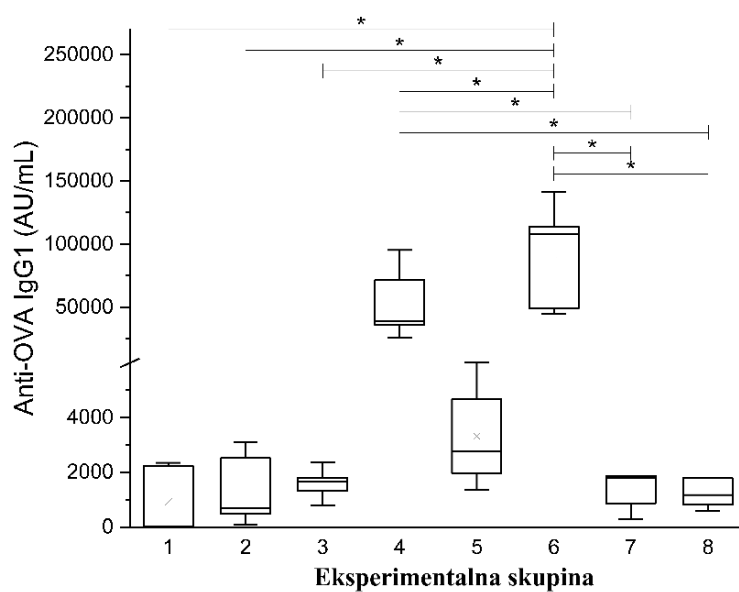
Omjer imunoglobulina IgG1/IgG2a u serumu je indirektni pokazatelj tipa imunološke reakcije (Th1 stanični imunološki odgovor, i Th2 humoralni imunološki odgovor). Omjer IgG1/IgG2a za eksperimentalne skupine imunizirane s OVA+MDP i OVA+Ac-FFA-NH₂ pokazuju da tripeptid Ac-FFA-NH₂ ima sposobnost induciranja i humoralnog i staničnog imuniteta. Također je zamijećeno da hidrogel Ac-FFβA-OMe može pomaknuti imunoreakciju u Th1 smjeru. Rezultati su pokazali da ispitani peptidni hidrogelovi mogu modulirati smjer imunološke reakcije od kojih Ac-FFA-NH₂ uravnoteženo pojačava oba tipa imunološkog odgovora (slika 47).

Mehanizmi djelovanja adjuvanta na molekulskoj, staničnoj i tkivnoj razini su različiti. Svi adjuvanti utječu na imunološki odgovor na primijenjene antigene kroz složene i višestruke mehanizme.^{25,204} Supramolekulski peptidni nanomaterijali prvenstveno predstavljaju depo-adjuvante, gdje stvaranje depoa, rezervoara, dovodi do sporog otpuštanja antigena na mjestu injekcije, regrutiranja imunoloških stanica na mjesto injekcije i pojačanog unosa antigena od strane antigen-prezentirajućih stanica (APC). Aktivacija stanično posredovane imunosti događa se kroz interakcije peptidnih hidrogelatora i specifičnih receptora na imunokompetentnim stanicama, kao što su antigen prezentirajuće stanice. Afinitet staničnih receptora i jačina interakcije ovise o brojnim čimbenicima, prvenstveno o kemijskoj strukturi adjuvanata koja pokreće Th1- ili Th2- tip imunološkog odgovora.²⁰⁵ Dobiveni rezultati pokazuju da testirani peptidni hidrogelovi ne samo da pojačavaju antigen-specifične imunološke odgovore, već također moduliraju ravnotežu između Th1 i Th2 puteva.

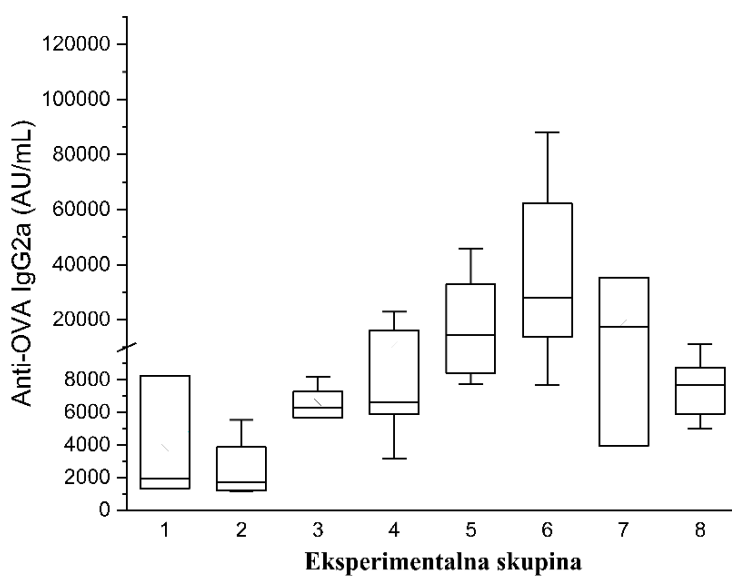
Ova dvostruka sposobnost sugerira njihov potencijal kao novih, snažnih i sigurnih adjuvantnih sustava za isporuku cjepiva. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se u potpunosti razjasnilo adjuvantno djelovanje ovih peptidnih hidrogelova.



Slika 45. Utjecaj adjuvanata na proizvodnju ukupnog anti-OVA IgGs u miševima; Eksperimentalne skupine: 1-OVA; 2-OVA+liposomi; 3-OVA+PGM; 4-OVA+MDP; 5-OVA+Imiquimod; 6-OVA+ Ac-FFA-NH₂; 7-OVA+Ac-FFβA-OMe; 8-OVA+Ac-FFA-OH; * $p < 0.05$ u usporedbi sa skupinom povezanom isprekidanim linijama.

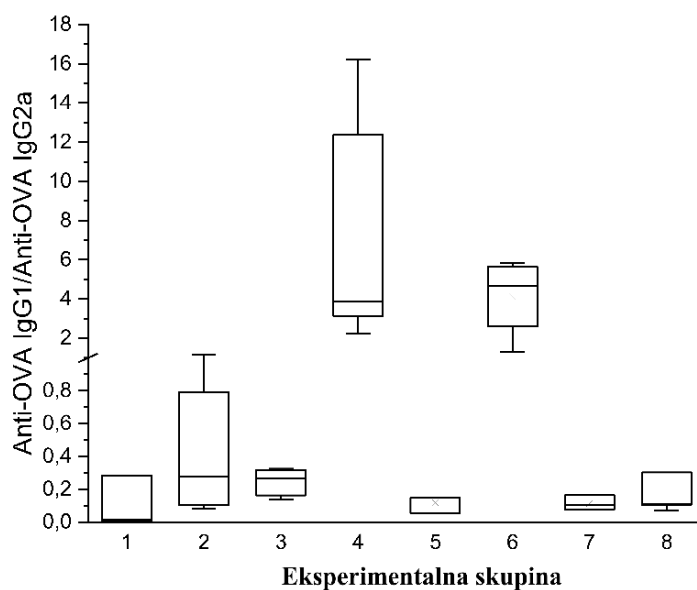


a)



b)

Slika 46. Utjecaj adjuvanata na proizvodnju imunoglobulina u miševima: a) anti-OVA IgG1; b) anti-OVA IgG2a; Eksperimentalne skupine: 1-OVA; 2-OVA+liposomi; 3-OVA+PGM; 4-OVA+MDP; 5-OVA+Imiquimod; 6-OVA+ Ac-FFA-NH₂; 7-OVA+Ac-FFβA-OMe; 8-OVA+Ac-FFA-OH; * $p < 0.05$ u usporedbi sa skupinom povezanom isprekidanim linijama.

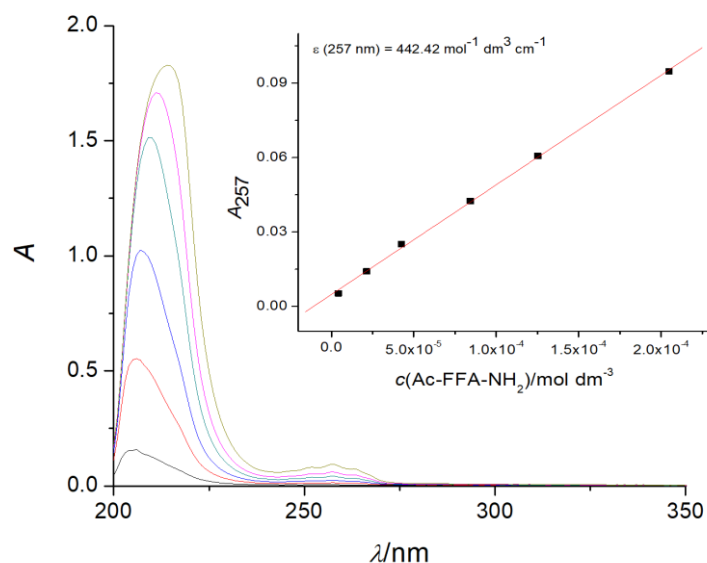


Slika 47. Omjer IgG1/IgG2a. Eksperimentalne skupine: 1-OVA; 2-OVA+liposomi; 3-OVA+PGM; 4-OVA+MDP; 5-OVA+Imiquimod; 6-OVA+ Ac-FFA-NH₂; 7-OVA+Ac-FFβA-OMe; 8-OVA+Ac-FFA-OH.

4.7. Otpuštanje biomolekula i malih molekula iz hidrogela Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH₂

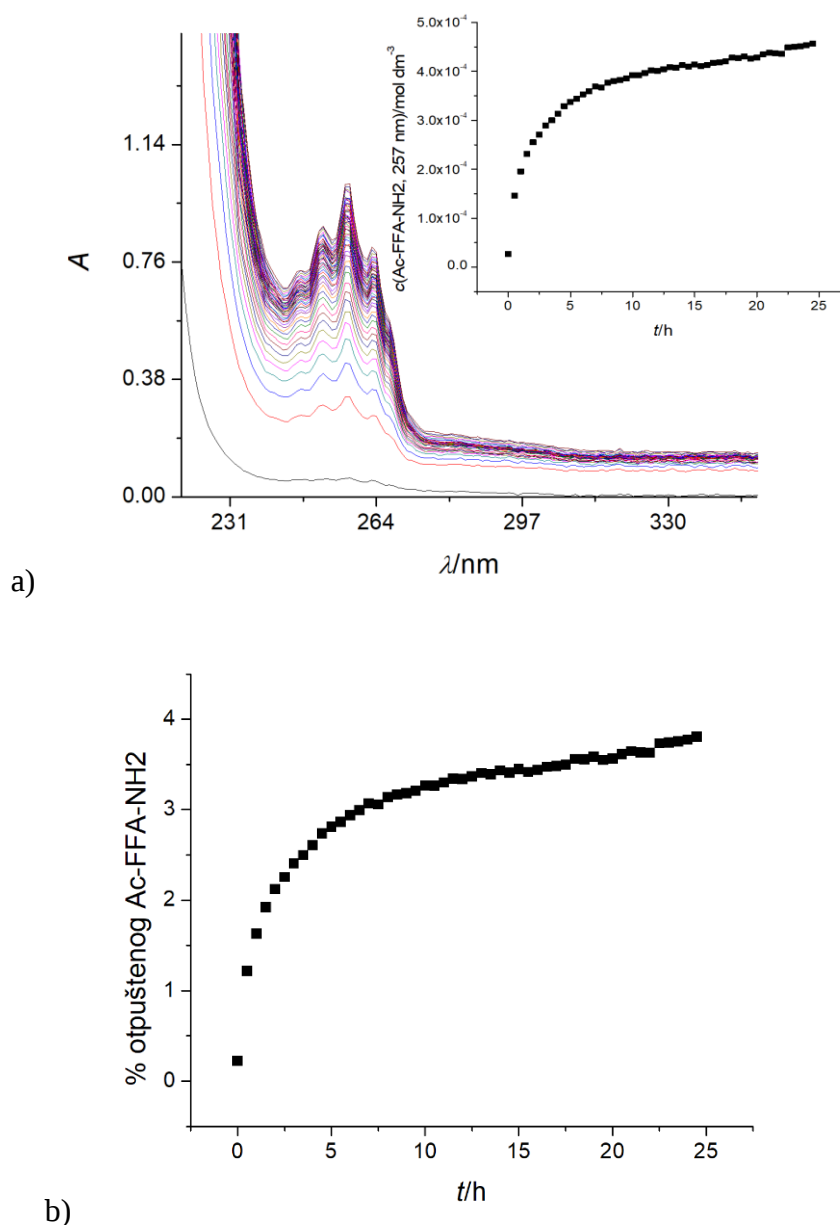
4.7.1. Baždarni dijagram i otpuštanje Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala-NH₂

Baždarni dijagram dobiven je mjerenjem maksimalne apsorbancije ($\lambda_{\max} = 257 \text{ nm}$) otopine Ac-FFA-NH₂ različitih koncentracija dodatkom početne otopine ($c_0 = 4,3 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u fosfatni pufer pH 7,36 (slika 48). Postupak provođenja eksperimenta opisan je u poglavlju 3.8.1.



Slika 48. Baždarni dijagram ovisnosti apsorpcije o koncentraciji Ac-FFA-NH₂; molarni apsorpcijski koeficijent (ϵ) pri 257 nm iznosi 442,42 mol⁻¹ dm³ cm⁻¹; Korelacijski koeficijenti za sve podatke (crvene linije) iznosi $R > 0,999$.

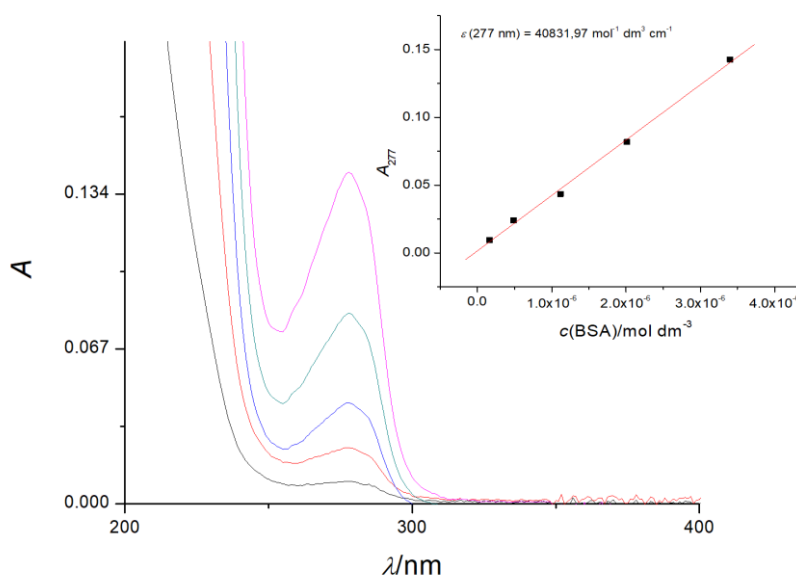
Količina otpuštenog Ac-FFA-NH₂ dobivena je mjerenjem maksimalne apsorpcije ($\lambda_{\text{max}} = 257$ nm) u fosfatnom puferu pH 7,4, kako je opisano u poglavlju 3.8.2. Prilikom otpuštanja javljaju se agregati u otopini što je vidljivo rastom bazne linije pri 300 nm (slika 49a). Rezultati su procijenjeni da se kroz razdoblje od 24 h, postupnim raspadom gela, otpusti 4 % spoja Ac-FFA-NH₂ (slika 49b).



Slika 49. a) Promjene apsorpcijskog spektra gelatora Ac-FFA-NH₂ u fosfatnom puferu pH 7,4 zbog otpuštanja samog gelatora, umetak: koncentracijski profil otpuštanja gelatora u vremenu od 24 h; b) postotak otpuštanja gelatora u vremenu od 24 h.

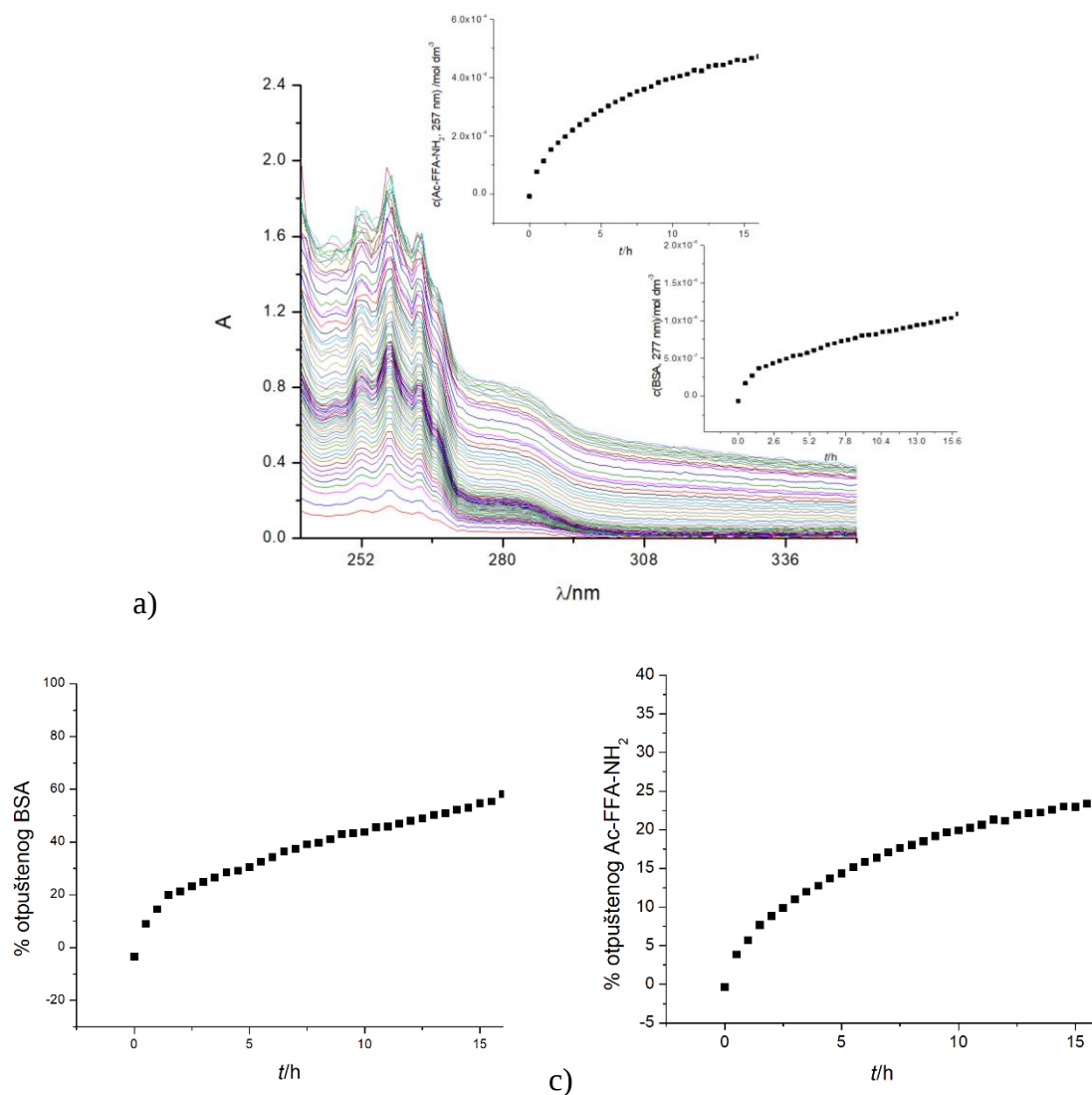
4.7.2. Baždarni dijagram i otpuštanje BSA

Baždarni dijagram dobiven je mjerenjem maksimalne apsorpcije ($\lambda_{\text{max}} = 277 \text{ nm}$) otopine BSA različitih koncentracija dodatkom početne otopine ($c_0 = 3,3 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) u fosfatni pufer pH 7,36 (slika 50). Postupak provođenja eksperimenta opisan je u poglavlju 3.8.1.



Slika 50. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji BSA; molarni apsorpcijski koeficijent (ϵ) pri 277 nm iznosi $40831,97 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$. Korelacijski koeficijenti za podatke (crvene linije) iznosi $R > 0,996$.

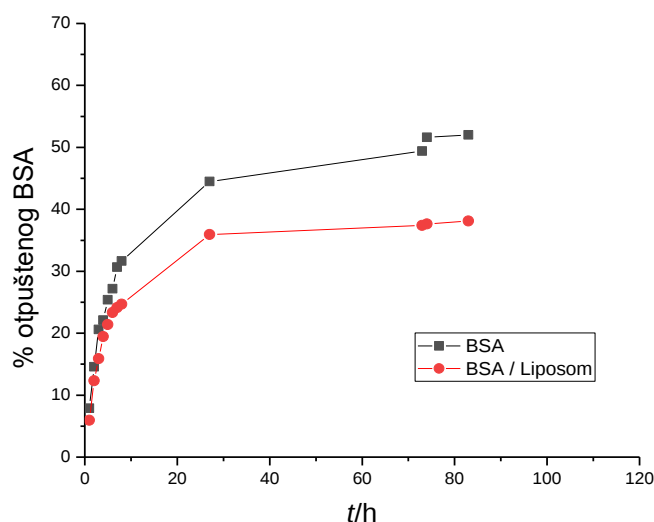
Količina otpuštenog BSA iz hidrogela Ac-FFA-NH₂ dobivena je mjerenjem maksimalne apsorbancije BSA ($\lambda_{\text{max}} = 277 \text{ nm}$) u fosfatnom puferu pH 7,4, kako je opisano u poglavlju 3.8.2. Prilikom otpuštanja javljaju se agregati u otopini što je vidljivo rastom bazne linije pri 300 nm (slika 51a). Rezultati su procijenjeni da se kroz razdoblje od 16 h otpusti 61 % proteina BSA dok se također paralelno otpušta i hidrogelator Ac-FFA-NH₂ (slika 51b,c). Nakon 16 h javlja se erozija gela što je vidljivo naglim porastom bazne linije.



Slika 51. a) Promjene apsorpcijskog spektra gelatora Ac-FFA-NH₂ u fosfatnom puferu pH 7,4 zbog otpuštanja BSA, umetak: koncentracijski profil otpuštanja gelatora i BSA u vremenu od 24 h; b) postotak otpuštanja BSA u vremenu 24 h; c) postotak otpuštanja gelatora u vremenu 24 h.

Otpuštanje BSA mjereno je i tehnikom u kiveti uzimanjem alikvota otpusnog medija kako je opisano u poglavlju 3.8.3. Otpuštanje je mjereno UV-Vis spektroskopijom pri istim uvjetima kroz 83 sata. Nevezani BSA nije izdvojen od liposomskih formulacija BSA i nije mjerena efikasnost vezanja. Na temelju prošlog istraživanja, procijenjeno je na 30 %.²⁰⁶ Koncentracija BSA je konstantna u oba uzorka radi usporedbe. Rezultati su pokazali slične profile otpuštanja. Otpuštanje je izračunato prema formuli: otpušteno (%) = (otpuštena koncentracija/ukupna koncentracija) × 100. Vidljiva je slična faza

naglog otpuštanja (engl. *burst phase*) u otpuštanju BSA u oba sustava; jedan sa slobodnim BSA gdje je otpušteno 27,2 % i uzorak hidrogela u koji je ugrađena liposomska formulacija BSA gdje je otpušteno 23,3 % u prvih 6 sati (slika 52). Naglo otpuštanje BSA u prvom dijelu grafa može se objasniti otpuštanjem BSA iz uzorka sa slobodnim BSA i otpuštanjem neugrađenog BSA koji nije prethodno uklanjen iz uzorka hidrogela s liposomskom formulacijom BSA. Nakon prvih 6 sati izgled krivulja divergira. U uzorku hidrogela sa slobodnim BSA, BSA sporo difundira kroz mrežu gela u pufer, dok u uzorku gela s liposomskim formulacijama BSA, liposomske membrane usporavaju prolazak BSA u hidrogel i nakon toga u nadslojen pufer. Nakon naglog otpuštanja vidljivo je da je otpuštanje slobodnog BSA (52 %) brže od otpuštanja BSA iz hidrogela koji sadrži liposomsku formulaciju BSA (38 %) unutar 83 h.

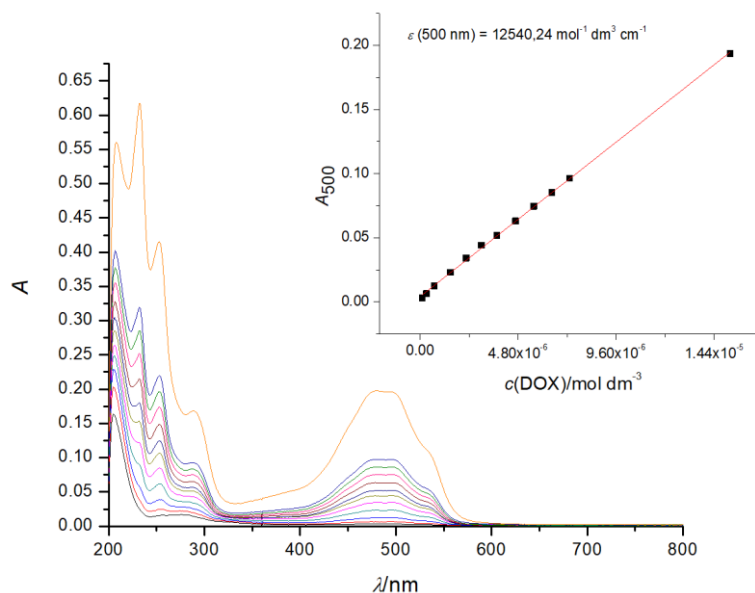


Slika 52. Kinetika otpuštanja BSA i BSA-u liposomima iz hidrogela Ac-FFA-NH₂.

Usporedbom dviju tehnika za praćenje otpuštanja BSA (sonda i kiveta) vidljivo je da je kinetika otpuštanja slična. Nešto brže otpuštanje se događa kod mjerenja sondom što se može pripisati većoj početnoj koncentraciji BSA u gelu ($c = 1,1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$), dok je kod mjerenja BSA u kivetu koncentracija iznosila $c = 7,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. Brže otpuštanje se također događa zbog koncentracijskog gradijenta kod kojeg se već za 16 h postiže plato zbog zasićenja. Kod mjerenja u kivetu prilikom uzimanja alikvota otopine i zamjenom s novim medijem se postiže manja koncentracija BSA u prihvatnom mediju zbog čega se potiče daljnje otpuštanje.

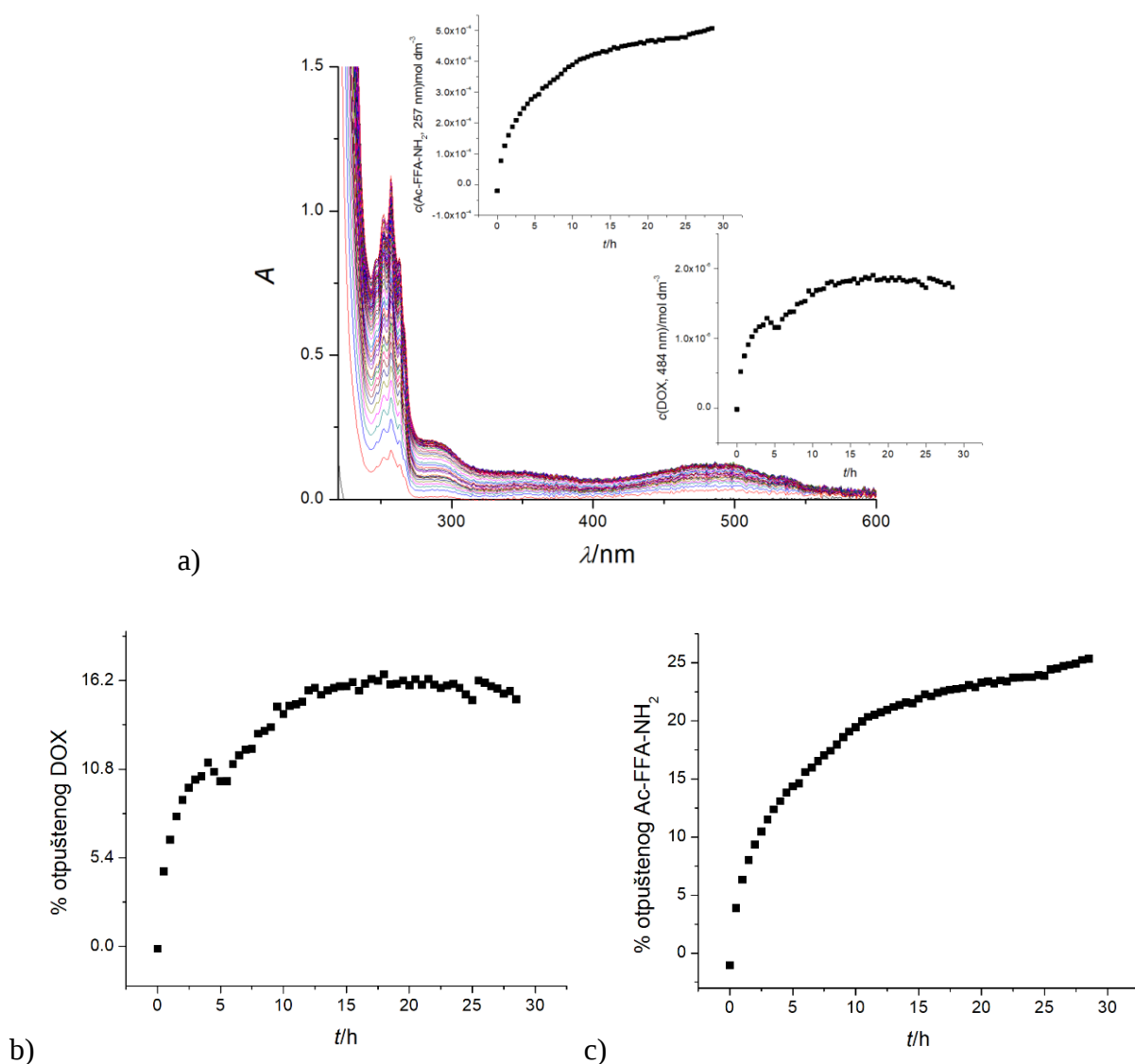
4.7.3. Baždarni dijagram i otpuštanje DOX iz hidrogela

Baždarni dijagram dobiven je mjerenjem maksimalne apsorbancije ($\lambda_{\max} = 500 \text{ nm}$) otopine doksorubicina (DOX) različitih koncentracija dodatkom početne otopine ($c_0 = 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) u fosfatnom puferu pH 7,36 (slika 53). Postupak provođenja eksperimenta opisan je u poglavlju 3.8.1.



Slika 53. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji DOX; molarni apsorpcijski koeficijent (ϵ) pri 500 nm iznosi $12540,24 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$. Korelacijski koeficijenti za sve podatke (crvene linije) iznosi $R > 0,999$.

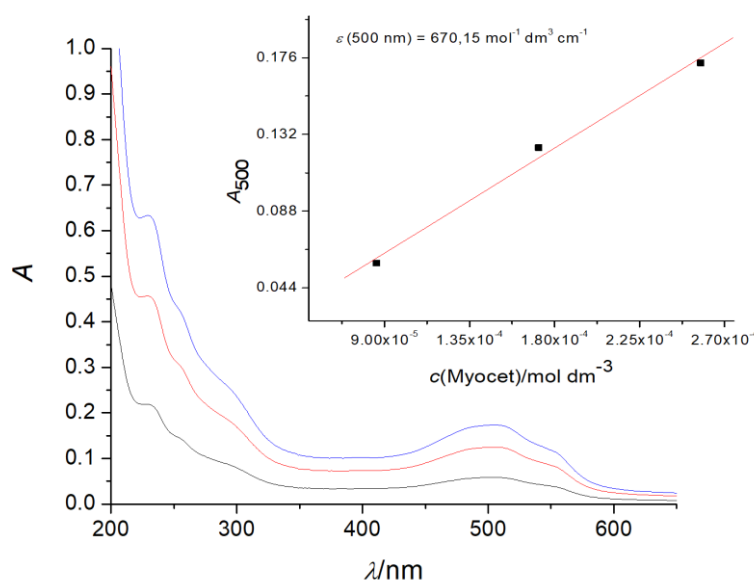
Otpuštanje doksorubicina iz hidrogela Ac-FFA-NH₂ dobiveno je mjerenjem maksimalne apsorbancije doksorubicina ($\lambda_{\max} = 500 \text{ nm}$) u fosfatnom puferu pH 7,4, kako je opisano u poglavlju 3.8.2. Rezultati su pokazali da se kroz vrijeme od 24 h otpusti 17 % spoja DOX dok se također paralelno otpušta i hidrogelator Ac-FFA-NH₂ (slika 54).



Slika 54. a) Promjene apsorpcijskog spektra gelatora Ac-FFA-NH₂ u fosfatnom puferu pH 7,4 zbog otpuštanja DOX, umetak: koncentracijski profil otpuštanja gelatora i DOX u vremenu od 24 h; b) postotak otpuštanja DOX u vremenu od 24 h; c) postotak otpuštanja gelatora u vremenu 24 h.

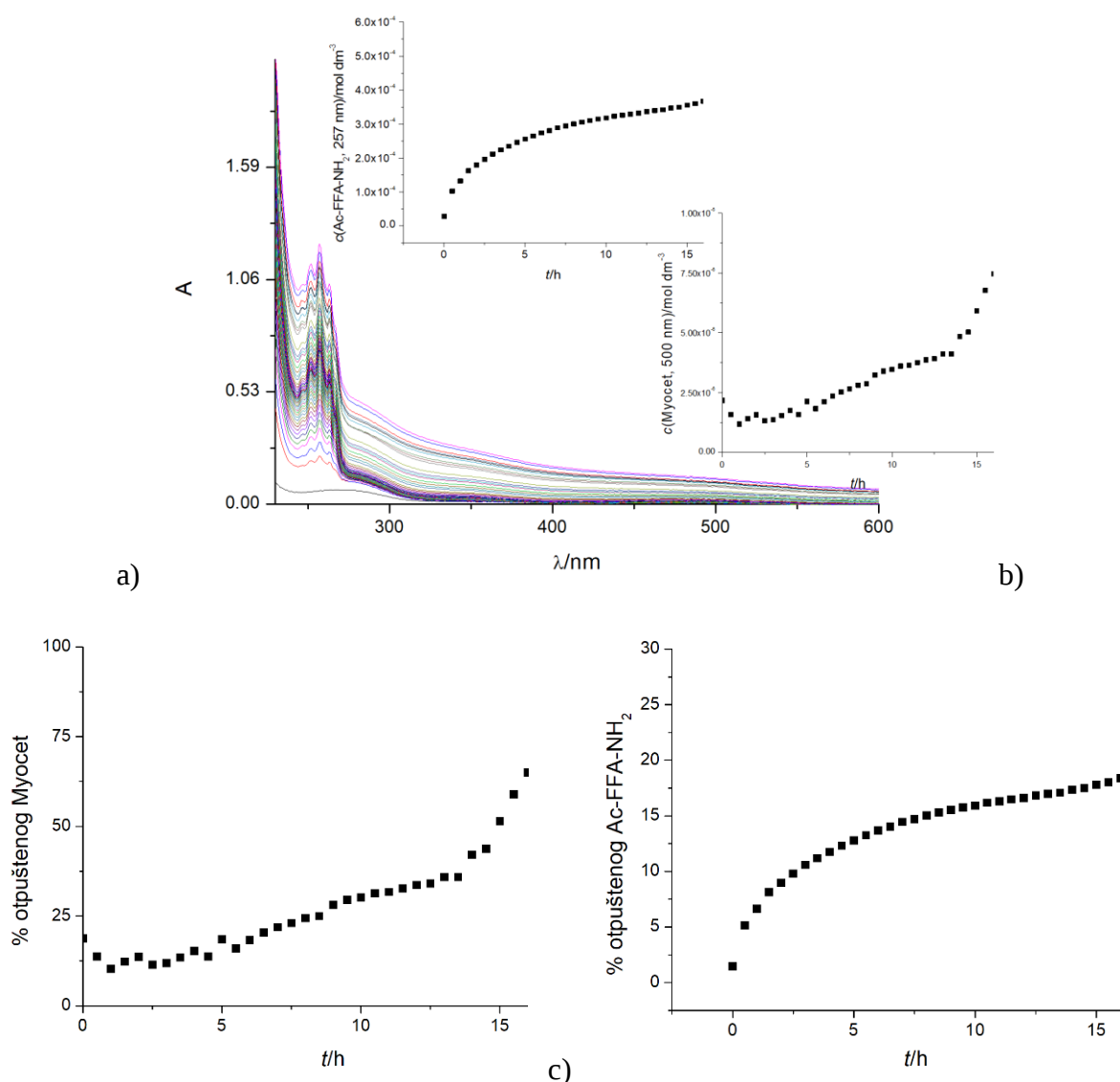
4.7.4. Baždarni dijagram i otpuštanje DOX iz liposomske formulacije ugrađene u hidrogel

Baždarni dijagram dobiven je mjerenjem maksimalne apsorbancije ($\lambda_{\text{max}} = 500 \text{ nm}$) otopine DOX u liposomima (Myocet) različitih koncentracija dodatkom početne otopine ($c_0 = 8,6 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) u fosfatni pufer pH 7,36 (slika 55). Postupak provođenja eksperimenta opisan je u poglavlju 3.8.1.



Slika 55. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji DOX u liposomima (Myocet); molarni apsorpcijski koeficijent (ϵ) pri 500 nm iznosi $670,15 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$. Korelacijski koeficijenti za sve podatke (crvene linije) iznosi $R > 0,985$.

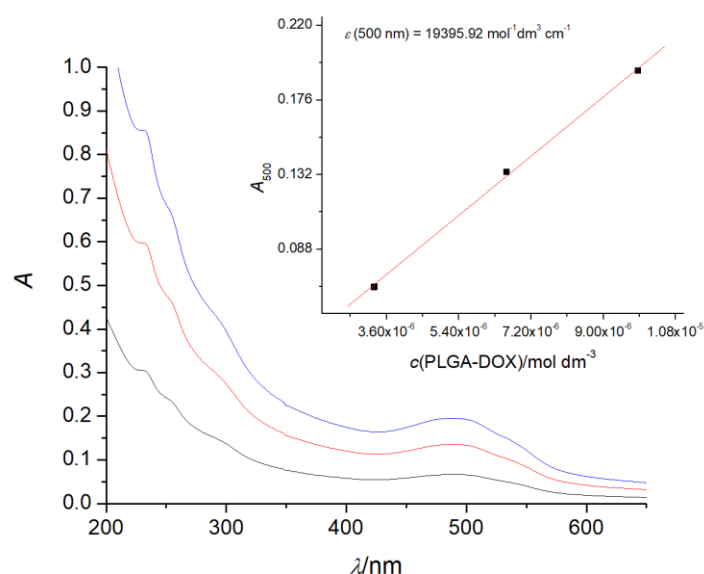
Količina otpuštenog DOX iz liposoma iz hidrogela Ac-FFA-NH₂ dobivena je mjerenjem maksimalne apsorbancije DOX iz liposoma ($\lambda_{\text{max}} = 500 \text{ nm}$) u fosfatnom puferu pH 7,4, kako je opisano u poglavlju 3.8.2. Prilikom otpuštanja javljaju se agregati u otopini što je vidljivo rastom bazne linije pri 300 nm (slika 56a). Rezultati su procijenjeni da se kroz vrijeme od 16 h otpusti 46 % DOX iz liposoma te iz hidrogela dok se također paralelno otpušta i hidrogelator Ac-FFA-NH₂ (slika 56b,c). Nakon 16 h javlja se erozija gela što je vidljivo naglim porastom bazne linije. Otpuštanje DOX iz liposoma za razliku od otpuštanja BSA iz liposoma nema naglog otpuštanja u početku zbog toga što nema prisutnih slobodnih molekula doksorubicina. Otpuštanje iz takvog sustava je više linearno.



Slika 56. a) Promjene apsorpcijskog spektra gelatora Ac-FFA-NH₂ u fosfatnom puferu pH 7,4 zbog otpuštanja DOX iz liposoma, umetak: koncentracijski profil otpuštanja gelatora i DOX iz liposoma u vremenu od 24 h; b) postotak otpuštanja DOX iz liposoma u vremenu od 24 h; c) postotak otpuštanja gelatora u vremenu od 24 h.

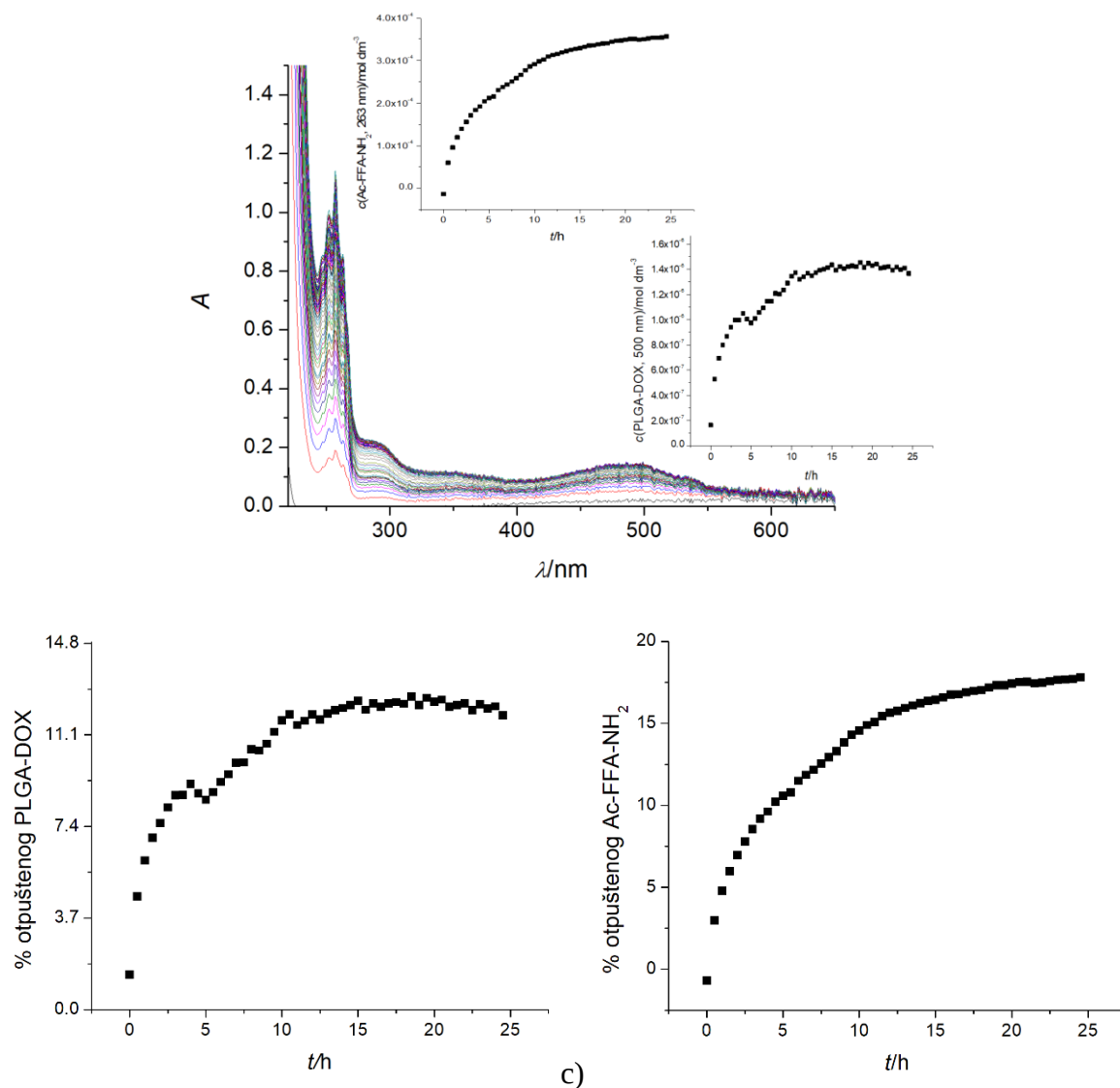
4.7.5. Baždarni dijagram i otpuštanje DOX iz PLGA-Dox ugrađen u hidrogel

Baždarni dijagram dobiven je mjerenjem maksimalne apsorbancije ($\lambda_{\text{max}} = 500 \text{ nm}$) otopine PLGA-Dox različitih koncentracija dodatkom početne otopine ($c_0 = 3,3 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$) u fosfatni pufer pH 7,36 (slika 57). Postupak provođenja eksperimenta opisan je u poglavlju 3.8.1.



Slika 57. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji DOX iz PLGA-Dox; molarni apsorpcijski koeficijent (ϵ) pri 500 nm iznosi $19395,92 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$. Korelacijski koeficijenti za sve podatke (crvene linije) iznosi $R > 0,997$.

Otpuštanje DOX iz PLGA-Dox iz hidrogela Ac-FFA-NH₂ dobiveno je mjerenjem maksimalne apsorbancije za DOX iz PLGA-Dox ($\lambda_{\text{max}} = 500 \text{ nm}$) u fosfatnom puferu pH 7,4, kako je opisano u poglavlju 3.8.2. Rezultati su procijenjeni te se kroz razdoblje od 24 h otpusti 13 % spoja PLGA-Dox dok se također paralelno otpušta i hidrogelator Ac-FFA-NH₂ (slika 58).



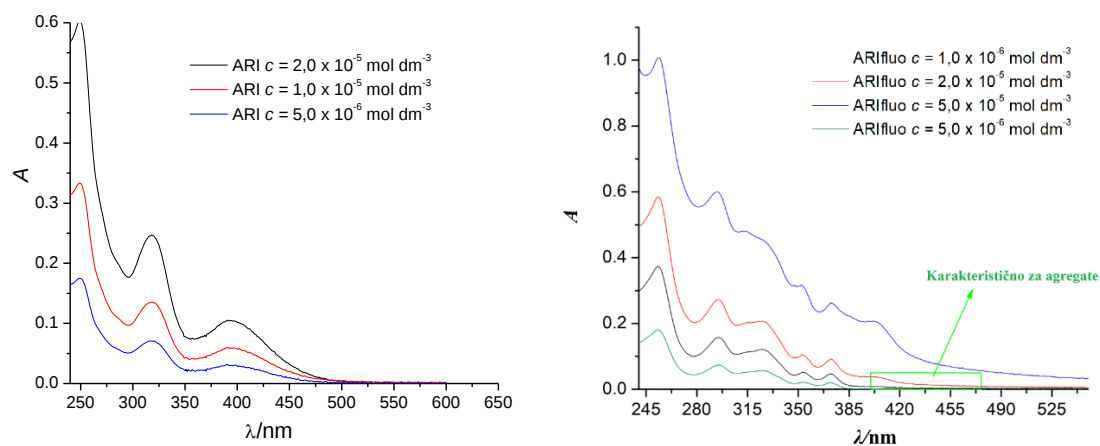
Slika 58. a) Promjene apsorpcijskog spektra gelatora Ac-FFA-NH₂ u fosfatnom puferu pH 7,4 zbog otpuštanja DOX iz PLGA-Dox, umetak: koncentracijski profil otpuštanja gelatora i DOX iz PLGA-Dox u vremenu od 24 h; b) postotak otpuštanja DOX iz PLGA-Dox u vremenu od 24 h; c) postotak otpuštanja gelatora u vremenu od 24 h.

4.8. Kompleksi ciklodekstrina s aristolohijskom kiselinom i malim biomolekulama

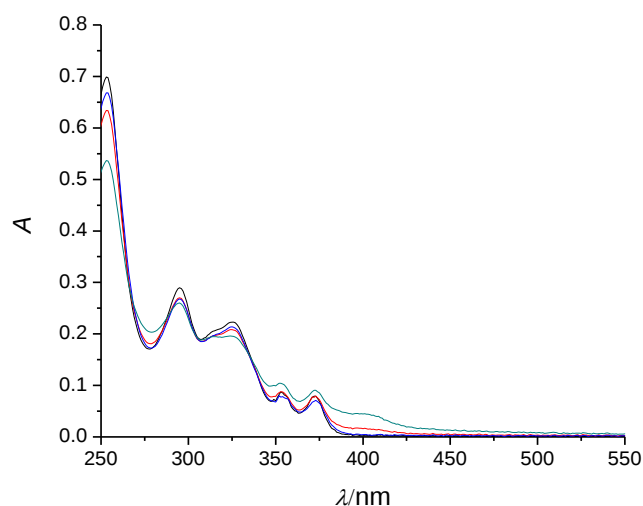
4.8.1. Karakterizacija derivata aristolohijske kiseline u biorelevantnom mediju

Fluorescentni derivat aristolohijske kiseline (ARIflo) je sintetiziran prema opisanoj proceduri.¹⁷⁰ Apsorbancija aristolohijske kiseline (ARI) i ARIflo u vodi je proporcionalna koncentraciji do $c = 2,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ (slika 59). Pri većim koncentracijama vidljiva je pojava koloidnih čestica, što je uočljivo povećanjem UV/Vis bazne linije u području $> 400 \text{ nm}$, pri

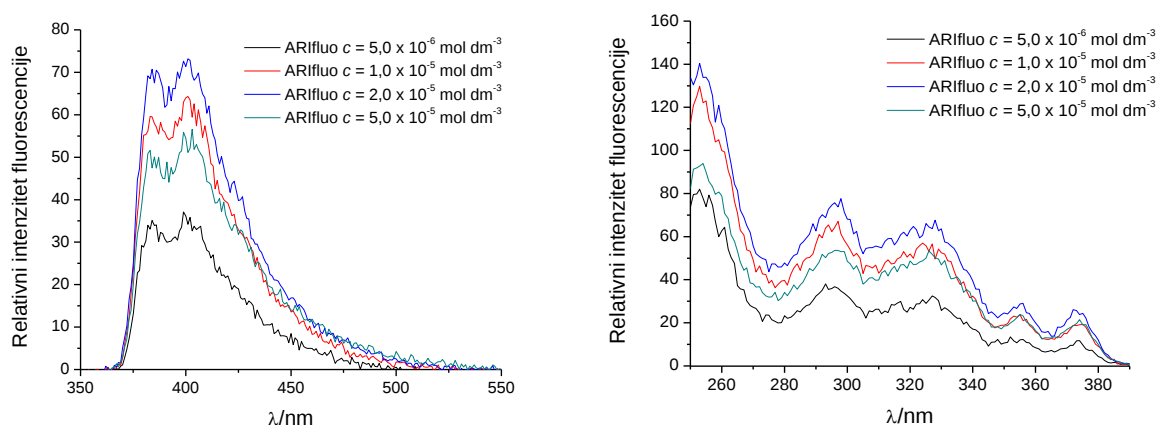
kojoj ARI ne apsorbira. S vremenom, uočena je precipitacija zbog čega su korištene svježije pripremljene otopine ARI $c < 2,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. Povećanje temperature otopine ARIfluo uzrokuje promjene u UV spektru (slika 60) smanjenjem apsorbancije bazne linije pri $\lambda > 400 \text{ nm}$, odnosno povećanjem topljivosti nastalih agregata. Hlađenjem na sobnu temperaturu nije zamijećena ponovna pojava agregata. Fluorescencija i UV spektri ARIfluo (slika 61) slažu se s literaturnim podacima,¹⁷⁰ do koncentracije $c = 2,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$.



Slika 59. UV-Vis spektri: ARI (lijevo) i ARIfluo (desno).



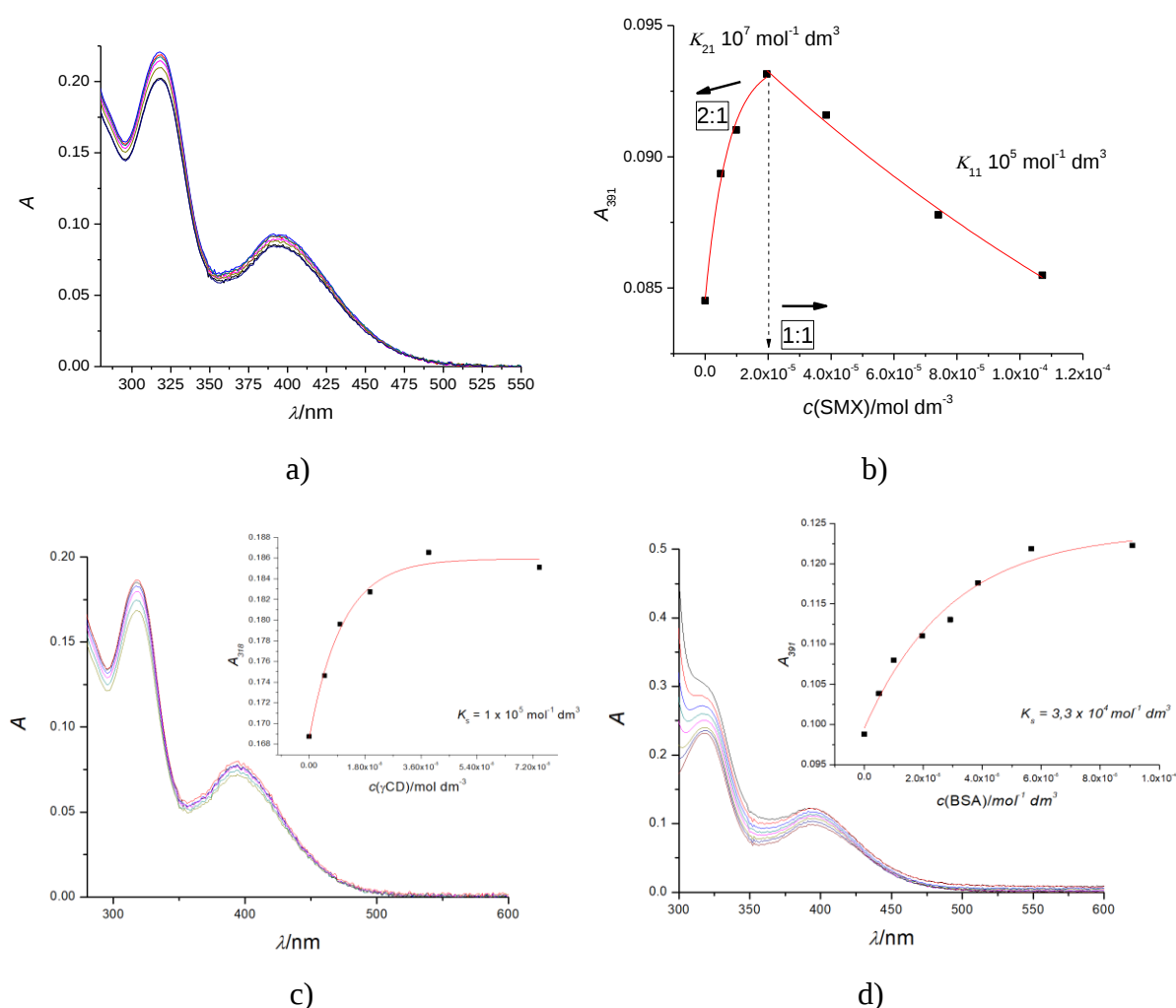
Slika 60. UV-Vis spektar ovisnosti ARIfluo o temperaturi; ARIfluo ($c = 2,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) u Mili-Q vodi (zeleno – $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, crveno – na 50 °C, plavo – na 90 °C, crno – ohlađeno nazad na 25 °C).



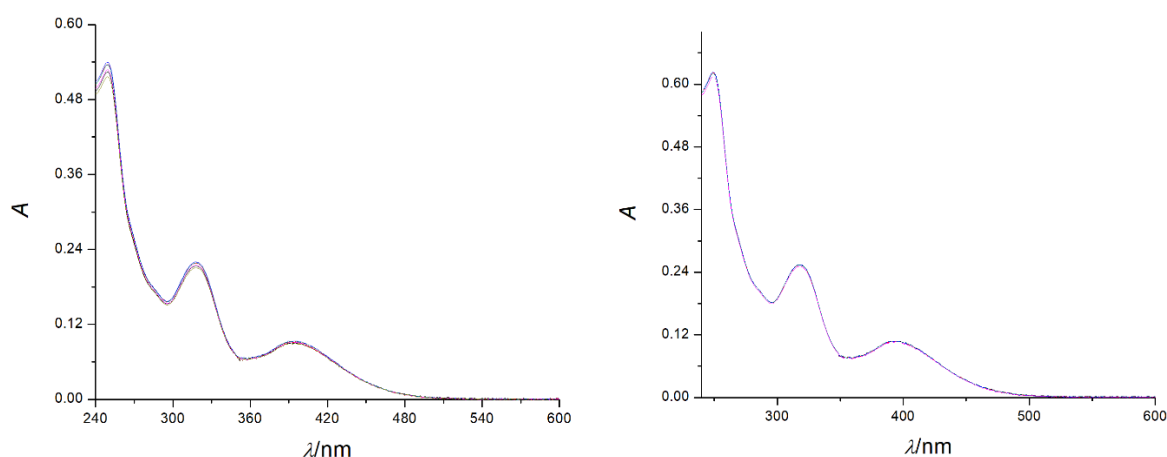
Slika 61. Lijevo: fluorescencijski spektri ARI ($\lambda_{\text{exc}} = 295 \text{ nm}$; inkubacija oko 30 sek.); Desno: ekscitacijski spektri ($\lambda_{\text{em}} = 400 \text{ nm}$) u Mili-Q vodi. Slitovi 2,5 nm 2,5 nm.

4.8.2. Interakcija aristolohijske kiseline s ciklodekstrinima i goveđim serumom albumina (BSA) i DNA iz telećeg timusa (ct-DNA)

Dodatak γ -CD, SMX ili BSA u otopinu ARI-ja, uzrokuje malu, ali mjerljivu promjenu u UV/Vis spektru ARI (slika 62) dok titracija s α - ili β -CD uzrokuje izrazito male promjene (slika 63). SMX jedino pokazuje nastajanje dva tipa kompleksa (slika 62b), najvjerojatnije zbog produženih „ruku“. Analiza kompletnih titracijskih podataka Specfit programom za multivarijantne analize^{172,181} daje najbolje podudaranje za dva formirana kompleksa; pri suvišku ARI u odnosu na SMX dominantni kompleks je ARI: SMX = 2 : 1. U prijelazu gdje SMX je dodan u suvišku dominantna stehiometrija kompleksa je 1 : 1. Male promjene u UV-Vis spektru omogućuju procjenu konstanti vezanja (K_{21} i K_{11}), no u suvišku SMX u odnosu na ARI (biološki važni uvjeti, jer SMX u kliničkom korištenju je dodan u visokim koncentracijama) 1:1 stehiometrija je dominantna i karakterizira je konstanta vezanja (K_{11}) u veličini $10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$. Male promjene u ARI UV/Vis spektru uzrokovane γ -CD ili BSA (slika 62c,d) omogućile su skupljanje 10-ak točaka i time analizu titracije nelinearnom regresijom na 1:1 stehiometriju kompleksa gdje je dobivena procijenjena konstanta vezanja. Konstanta vezanja tumači jače vezanje ARI s γ -CD ($K_s = 1 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$) u usporedbi s BSA ($K_s = 3,3 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$).

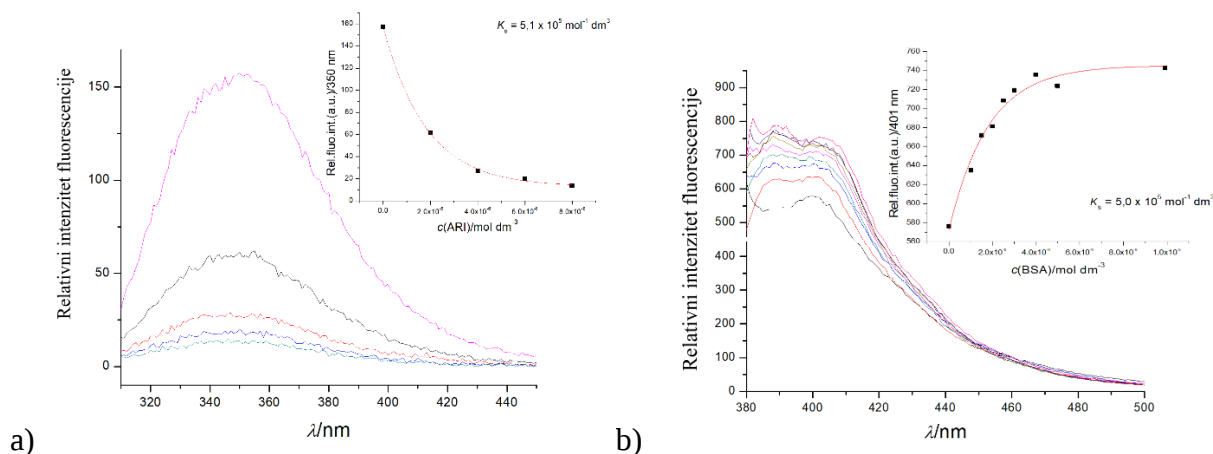


Slika 62. Promjene UV-Vis spektara ARI ($c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, Mili-Q voda) tijekom titracije s: a) SMX; b) ovisnost promjene apsorbancije ARI na 391 nm o koncentraciji sa SMX; sjecište krivulja odgovara stehiometriji 1:1, Specfit multivarijantna nelinearna regresijska analiza daje najbolje podudaranje za ARI/SMX = 2:1 i 1:1 stehiometriju; crvene linije predstavljaju izračunato slaganje te K_{21} i K_{11} predstavljaju procijenjene konstante vezanja; c) titracija s γ -CD; d) titracija s BSA. Dodatak na c) i d): crvene linije predstavljaju nelinearno podudaranje podataka na 1:1 model kompleksa s dobivenim konstantama vezanja (K_s). Korelacijski koeficijenti za sve podatke (crvene linije) iznosi $R > 0,966$.



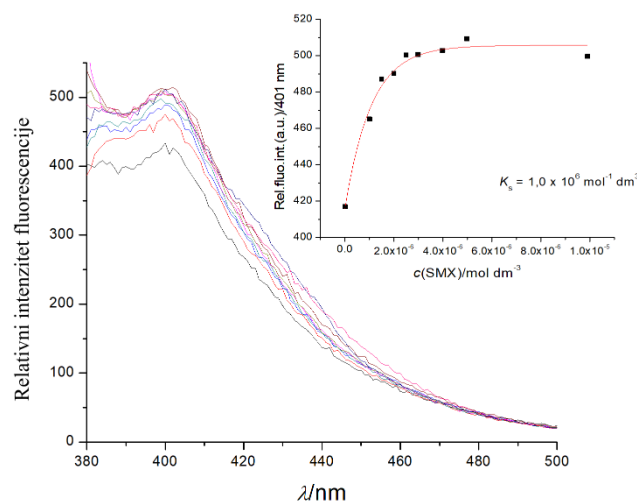
Slika 63. Promjene UV-Vis spektara tijekom titracije ARI ($c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, Mili-Q voda) s α -CD (lijevo) i β -CD (desno).

Nadalje, modificiran je ARI prema literaturnom postupku¹⁷⁰ u fluorescentni analog ARIf fluo, s namjerom direktnog praćenja promjena ARI kromofora prilikom vezanja, s ciljem dobivanja većeg broja titracijskih točaka zbog fluorescencijske osjetljivosti. Također, paralelno je provedena fluorimetrijska titracija gdje je praćena emisija BSA prilikom dodatka nefluorescentnog ARI (slika 64a) provedeno mjerenje savršeno odgovara literaturno poznatom¹⁶⁴. Odlično podudaranje K_s vrijednosti dobivene mjerenjem dvaju različitih fluorofora BSA i ARIf fluo (slika 64a,b) podržavaju teoriju da se ARIf fluo veže na isto mjesto na BSA kao i nefluorescentni ARI. Također, preklapanje titracijskih podataka savršeno odgovara 1:1 stehiometriji modela potkrijepljenoj jednom dominantnom veznom mjestu ARI na BSA.²⁰⁷



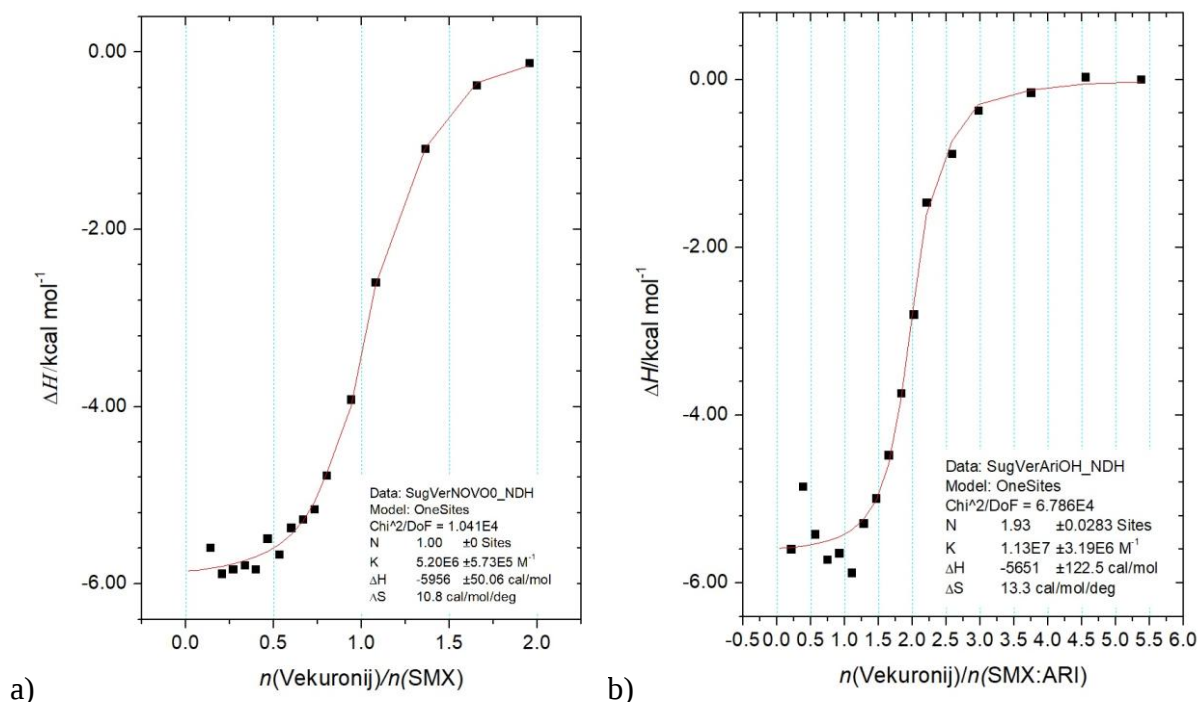
Slika 64. a) Promjene fluorescencijskih spektara BSA ($c = 2,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, $\lambda_{\text{exc}} = 295 \text{ nm}$) u titraciji s ARI; Ovisnost intenziteta fluorescencije BSA na $\lambda_{\text{max}} = 350 \text{ nm}$ u odnosu na $c(\text{ARI})$, pri pH 7,05, natrijev kalkodilatni pufer, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, slit 5nm, 5nm. b) Promjene u fluorescencijskom spektru ARIflo ($c = 2,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, $\lambda_{\text{exc}} = 375 \text{ nm}$) u titraciji s BSA; ovisnost emisije ARIflo na $\lambda_{\text{max}} = 401 \text{ nm}$ u odnosu na $c(\text{BSA})$, pri pH 7,05, natrijev kalkodilat pufer, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, slit 5nm, 5nm. Korelacijski koeficijenti za sve podatke (crvene linije) iznosi $R > 0,973$.

Titracija ARIflo sa SMX (slika 65) također je rezultirala porastom emisije gdje nelinearno regresijsko prilagođavanje titracijskih podataka na 1:1 stehiometriju kompleksa daje konstantu vezanja ($K_s = 1 \times 10^6 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$); vrijednost dvostruko veću u usporedbi s afinitetom ARIflo prema BSA ($K_s = 6 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$). Vezne konstante predviđene UV/Vis titracijama (slika 62) također pokazuju aproksimativno duplo veći afinitet ARI prema γ -CD ili SMX u usporedbi s BSA.



Slika 65. Promjene fluorescencijskog spektra ARIflo ($c = 2,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, $\lambda_{\text{exc}} = 375 \text{ nm}$) u titraciji s SMX; Dodatno: ovisnost emisije ARIflo na $\lambda_{\text{max}} = 401 \text{ nm}$ ($\lambda_{\text{exc}} = 375 \text{ nm}$) u ovisnosti o $c(\text{SMX})$, pri pH 7,05, natrijev kalkodilat pufer, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, slit 5 nm, 10 nm. Korelacijski koeficijent za podatke (crvena linija) iznosi $R > 0,978$.

Dodatno je afinitet vezanja ARI sa SMX ispitan metodom izotermalne titracijske kalorimetrije (engl. *Isothermal titration calorimetry*, ITC) koja se koristi kao standardna metoda karakterizacije kompleksa SMX sa lijekom.¹⁵⁵ Prvi pokušaj praćenja literaturne procedure za SMX studije¹⁵⁵ dodavanjem ARI u SMX je bio neuspješan zbog slabe topljivosti ARI u vodi. Zamjenom titranda i titransa tj. dodavanjem SMX u otopinu ARI je bilo neuspješno zbog pojave precipitacije tijekom titracije, što je vidljivo u kontrolnim eksperimentima mjerenim UV/Vis spektroskopijom. Nadasve, pokušali smo kompeticijski eksperiment, koji je započet uobičajenim ITC eksperimentom dodatkom lijeka (Vekuronijem) u SMX (slika 66a) te zatim provođenjem druge ITC titracije u kojoj SMX/ARI kompleks (1:1 stehiometrije, dodan u ćeliju, slične koncentracije kao u fluorimetrijskim titracijama) je titriran s lijekom (Vekuronijem) (slika 66b).



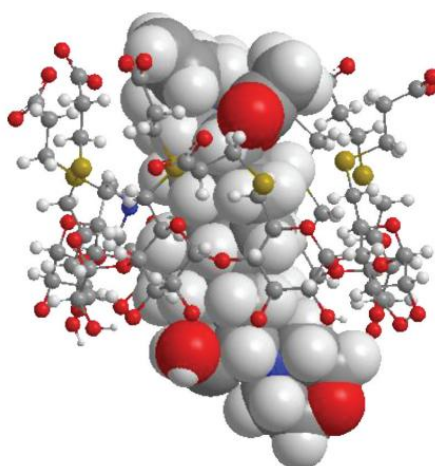
Slika 66. a) mikrokolorimetrijska titracija spoja SMX ($c = 4 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) s vekuronijem (u šprici, $c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, dodan pri određenim molarnim omjerima;) u $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ fosfatnom puferu pri pH 7,0 i temperaturi $25,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$; b) kompetitivan eksperiment; mikrokolorimetrijska titracija 1:1 SMX/ARI smjese ($c = 4 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) s vekuronijem (u šprici, $c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, dodan pri određenim molarnim omjerima); točke predstavljaju eksperimentalne podatke, izračunato podudaranje za model „Jedno dominantno mjesto vezanja“ je crvena linija.

Oba ITC termograma (slika 66) su bila slična što omogućuje preciznu kvantitativnu analizu. Unatoč tome, uočljiva je razlika u ukupnoj promjeni entalpije (ΔH) (tablica 16) gdje prisutnost ARI smanjuje ΔH za oko 15 % ($\Delta(\Delta H) = -1000 \text{ cal mol}^{-1}$), što se može pripisati kompetitivnom vezanju ARI i vekuronija na SMX i slaže se s redom veličine manjeg afiniteta ARI prema SMX u odnosu na vekuronij ($K_s = 1,8 \times 10^7 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$).¹⁵⁵ ITC eksperiment barem kvalitativno podržava vezanje ARI sa SMX slično kao sa vekuronijem.

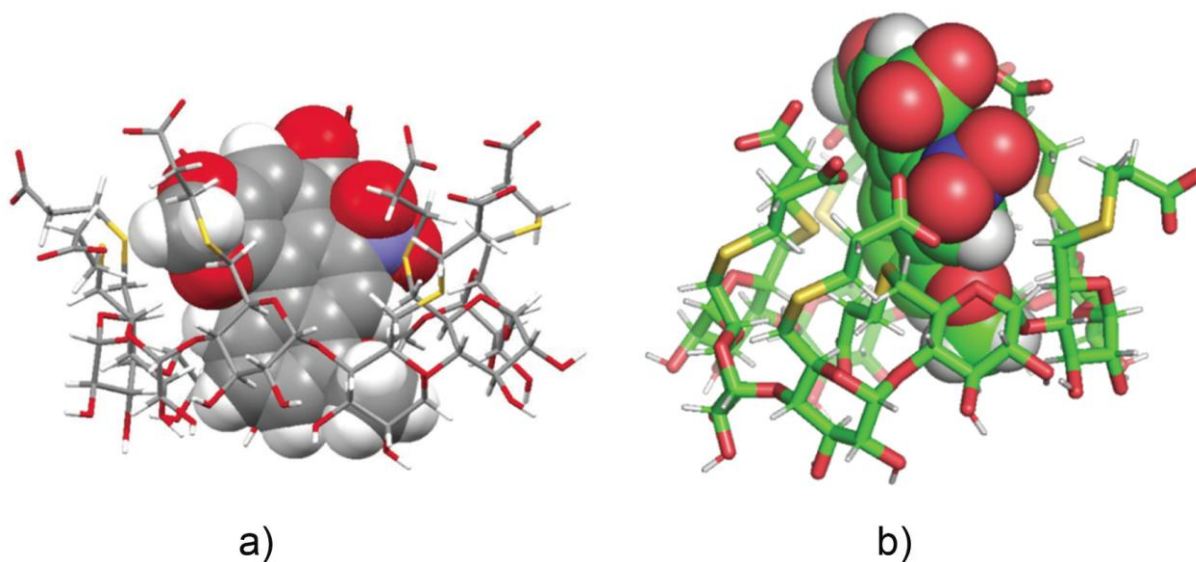
Tablica 16. Vrijednosti termodinamskih parametara dobivenih ITC mjerenjima.

Uzorak	Vekuronij($c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$)			
	N	$\Delta H/\text{cal mol}^{-1}$	$K/\text{mol}^{-1}\text{dm}^3$	$\Delta S/\text{cal mol}^{-1} \text{deg}^{-1}$
SMX($c = 4 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$)	1,0	$-5956 \pm 50,1$	$5,20 \times 10^{-6}$	10,8
SMX:ARI (1:1 kompleks, $c = 4 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$)	1,9	$-5651 \pm 122,5$	$1,13 \times 10^{-7}$	13,3

Slaba topljivost ARI analoga u vodi otežava ispitivanja NMR i pripravu monokristala za kristalografiju rendgenskih zraka. Kako bi se evaluirala struktura ARI/SMX kompleksa, pokušano je modeliranje koje se često koristi za CD-inkluzijske komplekse.²⁰⁸ Inicijalno smo se oslonili na rokuronij/SMX strukturu (slika 67) koja je dobivena difrakcijom rendgenskih zraka (CCDC ref: 172247)¹⁶⁸. Kristalna struktura ARI (CCDC ref: 673035)¹⁶⁸ je korištena kao struktura liganda. Prvo, molekulsko uklapanje (engl. *molecular docking*) i molekulsko modeliranje provedeni su koristeći Tripos polje sila (engl. *Tripos force field*) implementiran u SYBYL-X programski paket, koristeći FlexiDock modul.²⁰⁹ Rokuronij u SMX šupljini je zamijenjen ARI u dvije različite orijentacije: polarna karboksilna skupina je locirana unutar β -CD šupljine i suprotno. Optimizacija (s udaljenost-ovisnom dielektričnom konstantom za vodu $\epsilon = 78$) dala je obitelj konformera s najmanjom minimalnom energijom s karboksilnom skupinom ARI orijentiranom prema primarnoj hidroksilnoj skupini glukopiranoze SMX molekule, dok je aromatski dio ARI u hidrofobnoj šupljini SMX i formira nekoliko lipofilnih interakcija (slika 68). Suprotna ARI orijentacija (karboksilna skupina u SMX šupljini) ima 4 kcal mol⁻¹ višu energiju. Nadalje molekulska dinamička simulacija na strukturi optimizirana molekulskim uklapanjem (slika 68a) je izvedena na Amber2020 programskom paketu.²¹⁰ SMX i ARI su opisani koristeći parametre GAFF2 polje sila, preporučene za organske ligande.²¹¹



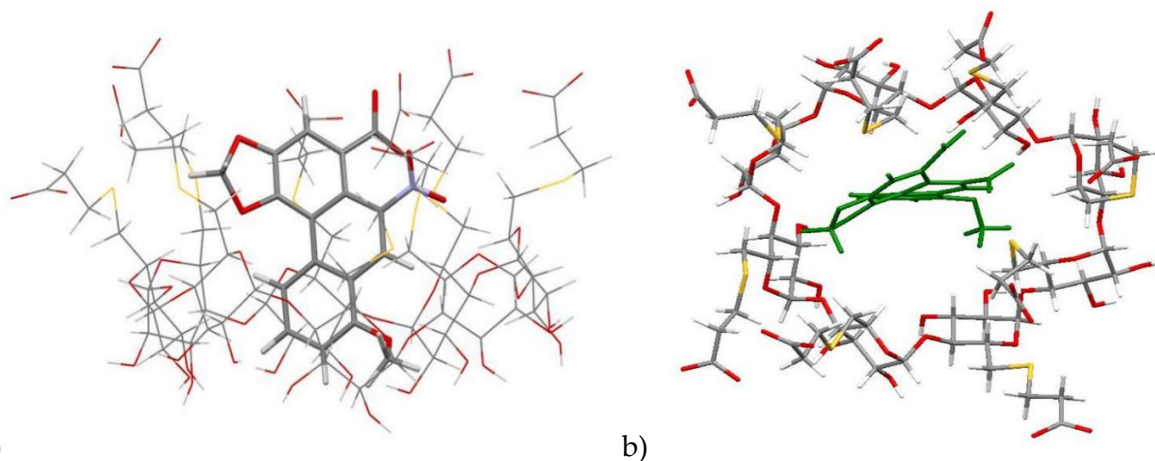
Slika 67. Rokuronij u kompleksu sa SMX.¹⁶⁸



Slika 68. a) Strukture optimizirane molekularnim dokingom ARI (VdW kuglice)/SMX (štapići) kompleksa; b) molekulski dinamički optimizirana struktura u vodi, nakon 5 ns pri $T = 300$ K, $p = 1$ atm. Molekule vode su izostavljene radi preglednosti.

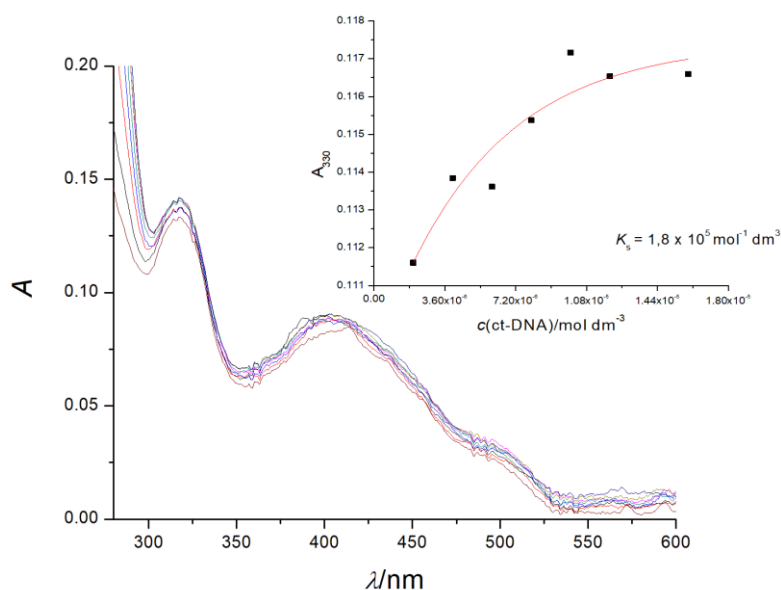
Sustav je simuliran u TIP3P vodenj kubičnoj kutiji (dimenzija $41.8 \text{ \AA}$)²¹², s periodičnim rubnim uvjetima, koji se sastoji od nekoliko tisuća vodenih molekula tretiranih eksplicitno. Simulacije su provedene u 4 dijela: minimizacija, zagrijavanje, ekvilibracija te završna dinamika. Geometrijska optimizacija je provedena najstrmijim silaskom i konjugiranom gradijentnom metodom. Sustav je zagrijavan od 100 do 300 K koristeći Langevin termostat pri konstantnom volumenu²¹³, nakon čega slijedi ekvilibracijski korak pri konstantnoj temperaturi

i tlaku: $T = 300\text{ K}$, $p = 1\text{ atm}$ koristeći Berendsenov barostat.²¹⁴ Molekulska dinamička simulacija je određivana za 5 ns s vremenskim korakom od 0.1 fs. Odrežani radijus za nekovalentne van der Waals (VdW) i kratkog dometa Coulombove interakcije iznosio je 9 Å. Daleko dometne Coulombove interakcije su tretirane Evaldovom metodom (engl. *Ewald method*) te implementirane u čestičnu mrežu Evald (PME) procedura.²¹⁵ Slika optimizirane molekulske strukture (slika 68b) je izvedena koristeći Pymol program.²¹⁶ Analiza rezultata molekulskog modeliranja pokazalo je da ARI može lijepo sjesti u SMX šupljinu, okupirajući područje slično kao Rokuronij (slika 67) i s hidrofilnom karboksilnim skupinama orijentiranim prema vodi. Dominantne vezne interakcije izgledaju kao kombinacija hidrofobnih efekta velike aromatske jezgre ARI-ja, pomješano s VdW interakcijama unutar SMX šupljine.



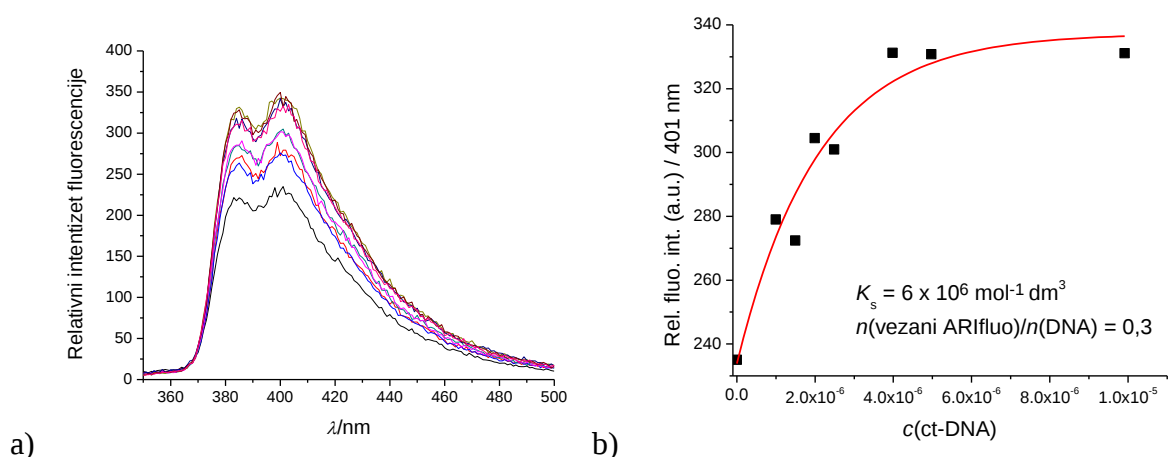
a) b)
Slika 69. Optimizirana niskoenergetska struktura Sugamadeksa/kompleksa aristolohijske kiseline na bazi spajanja. a) Bočni pogled na domaćin-gost kompleks koji prikazuje aristolohijsku kiselinu (štapić) unutar šupljine β -CD, pokazujući da dvije strukture imaju mnogo bliskih kontakata i međusobno su visoko komplementarne, b) Pogled odozgo prema dolje s karboksilne strane koji prikazuje CD prsten s alkilnim bočnim lancima koji sadrže karboksil koji labavo okružuju acetatnu skupinu na aristolohijskoj kiselini (zeleno).

Obzirom da prema literaturi, kovalentna konjugacija ARI s ds-DNA je jedan od razloga ARI toksičnosti, također su ispitane nekovalentne interakcije ARI s ct-DNA kako bi se vidjelo prethodi li nekovalentno vezanje kemijskoj konjugaciji. Dodatak ct-DNA rezultirao je u neznatnim promjenama u ARI UV/Vis spektru (slika 70).



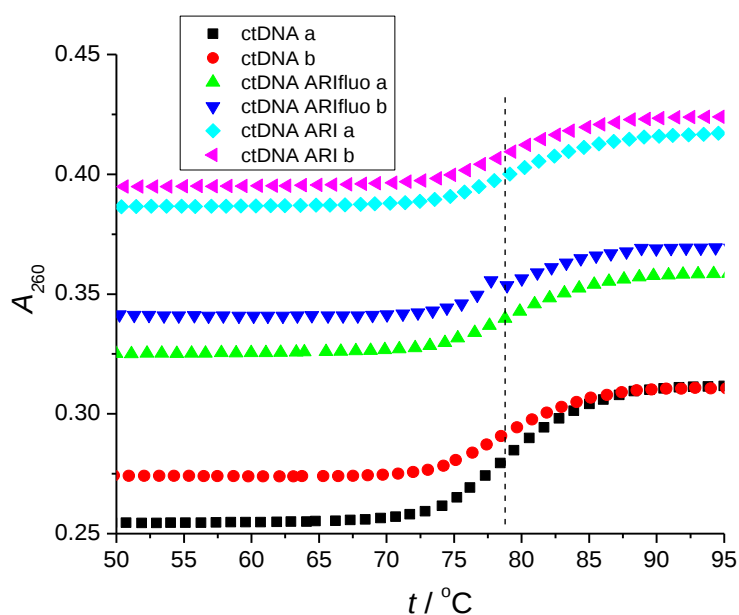
Slika 70. Promjene UV/Vis spektara tijekom titracije ARI ($c = 2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) s ct-DNA ($c = 1,4 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) u fosfatnom puferu pH 7 pri 25,0 °C; $V_0 = 22,0 \text{ cm}^3$; Ovisnost apsorpcije ARI pri 330 nm o koncentraciji ct-DNA u fosfatnom puferu pH 7.

Unatoč tome, fluorimetrijska titracija s ct-DNA uzrokuje znatan porast (oko 50 %) koji potječe od ARIfuo emisije (slika 71a). Analiza titracijskih podataka pomoću nelinearnog slaganja prema Scatchardovoj jednadžbi²¹⁷ dobivena je konstanta u iznosu $K_s = 6 \times 10^6 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$ sa Scatchardovim omjerom $n(\text{vezani ARIfuo})/n(\text{DNA}) = 0,3$ (slika 71b).



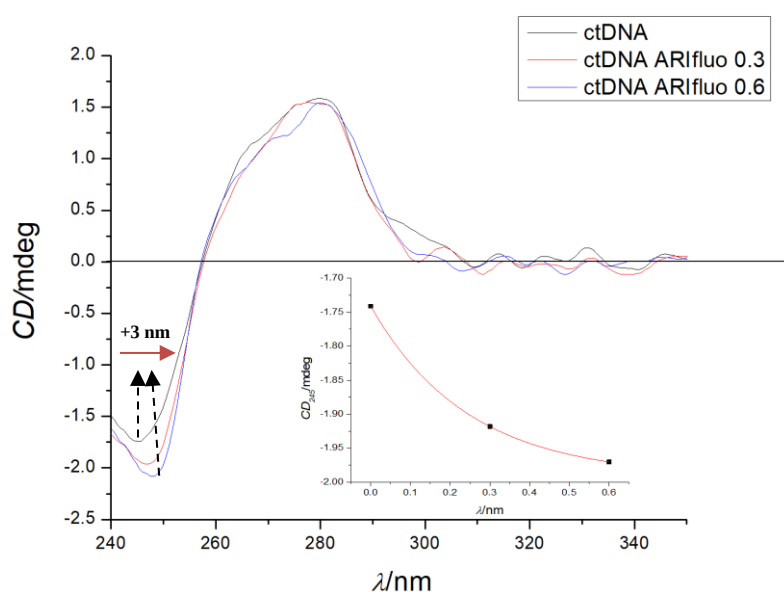
Slika 71. a) Promjene u fluorescencijskom spektru ARIfuo ($c = 2,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, $\lambda_{\text{exc}} = 330 \text{ nm}$; vrijeme inkubacije 60 sec.) pri titraciji s ct-DNA, slit 5 nm, 5 nm; b) ovisnost ARIfuo emisije pri $\lambda_{\text{max}} = 401 \text{ nm}$ o $c(\text{ct-DNA})$, podaci se podudaraju s nelinearnom regresijom prema Scatchardovoj jednadžbi pri pH 7; natrij kakodilatni pufer, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$. Korelacijski koeficijent za sve podatke (crvena linija) iznosi $R > 0,995$.

U termalnim denaturacijskim eksperimentima (slika 72), dodatak ARI ili ARIfuo nije stabilizirao ct-DNA protiv termalne denaturacije, time isključujući interkalacijski način vezanja.^{182,218}



Slika 72. Termičke denuracijske krivulje ct-DNA ($c(\text{ct-DNA}) = 2,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $r_{[(\text{ARI})]/[\text{ct-DNA}]} = 0,3$) pri pH 7,0 (natrij kakodilat pufer, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$) prilikom adicije ARI i ARIflo. Pogreška u ΔT_m vrijednostima: $\pm 0,5 \text{ } ^\circ\text{C}$.

Spektroskopija cirkularnog dikroizma je primijenjena kao vrlo informativna metoda o strukturalnim promjenama u ds-DNA sekundarnoj strukturi kao uzrok vezanju akiralnih malih molekula (primjer ARIflo), koje ne posjeduju intrinzični CD spektar.²¹⁹ Zaista, dodatak ARIflo uzrokovao je malo, ali značajno povećanje intenziteta negativnog maksimuma ct-DNA pri 245 nm, kao i batokromni pomak maksimuma za +3 nm (slika 73).



Slika 73. Promjena spektra CD ct-DNA ($c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) u titraciji s ARIflo gdje je $r_{[(\text{ARI})]/[\text{ct-DNA}]} = 0,3$ i $0,6$, pri pH 7,0 (natrij kakodilat pufer, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$). Umetak: promjena signala CD krivulje pri $\lambda = 245 \text{ nm}$ u odnosu na omjer $r_{[(\text{ARI})]/[\text{ct-DNA}]}$.

Nadalje, nelinearna ovisnost CD (245 nm – slika 73; umetak) promjene intenziteta podržava nekovalentnu interakciju kao uzrok spektroskopskih promjena. CD krivulja na 245 nm pripisana je okosnici DNA, time vidljive promjene indiciraju da vezanje ARIflo utječe na sekundarnu strukturu DNA dvostruke uzvojnice. Odsutnost mjerljivih promjena na ds-DNA pozitivnom maksimumu na 280 nm (pripisane parovima baza) predlažu da ARIflo ne stvara nikakvo značajno aromatsko slaganje niti interakcije s nukleobazama (ponovno isključujući interkalaciju). Dalje, akiralne male molekule mogu, prilikom vezanja s ds-DNA, steći inducirani (I) CD signal⁹⁸, smješten na apsorpcijskoj veznoj vrpici male molekule, u ovom slučaju ARIflo u rasponu 300-400 nm. Također, odsutnost svih CD vrpki $>300 \text{ nm}$ (slika 73) sugeriraju da ARIflo prilikom vezanja za ds-DNA nije jednoliko orijentiran u odnosu na DNA kiralnu os, već je vrlo vjerojatno heterogeno posložen uzduž DNA okosnice, time uzrokuje minimalnu promjenu u CD spektru. Time, ovdje ispitivani ARI analozi vežu nekovalentno za ds-DNA mješovit, ne specifičnim načinom vezanja, ali sa biorelevantnim afinitetom koji se može usporediti sa afinitetom vezanja ARI za BSA. Takve nekovalentne interakcije s ds-DNA mogu biti prekursor literaturno opisanoj biotransformaciji ARI¹⁶⁵, koja je esencijalni korak za kovalentnu konjugaciju za ds-DNA odgovornu za ARI toksična i kancerogena svojstva.

§ 5. ZAKLJUČAK

Primjenom klasičnih sintetskih metoda peptidne kemije u otopini sintetizirani su kratki tripeptidi slijeda aminokiselina FFA s različitim zaštitnim skupinama na N i C krajevima. Također, sintetizirani su FFA tripeptidi različitih slijeda konfiguracija aminokiselina L,L,L i L,D,L. Ispitana su gelirajuća svojstva spojeva u vodi, organskim otapalima i smjesama različitih otapala. Acetilni tripeptidi L-Phe-L-Phe-L-Ala sa zaštićenim krajem -OMe i -NH₂ pokazali su se kao vrlo dobri gelatori vode i polarnih otapala, ali i aromatskih otapala. Acetilni tripeptid L-Phe-L-Phe-L-Ala sa slobodnom karboksilnom kiselinom na C kraju pokazao je općenito slaba gelirajuća svojstva. Fmoc-tripeptid L,L,L konfiguracije se pokazao kao slabi gelator jednostavnih alkohola i aromatskih spojeva. Konfiguracijski izomer acetilnog peptida L-Phe-D-Phe-L-Ala s -OMe zaštićenim krajem pokazao se kao dobar gelator vode, a nešto slabiji gelator acetonitrila i smjesa otapala dok je isti izomer s -NH₂ krajem pokazao slaba gelirajuća svojstva vode i acetonitrila. Fmoc-tripeptid L,D,L konfiguracije pokazao se kao dobar gelator jednostavnih alkohola.

Morfologija gelova, utvrđena TEM-om, jasno je pokazala ovisnost morfologije o vrsti korištenog otapala. Povećanjem polarnosti otapala povećala se gustoća niti u gelu, pri čemu se povećala i širina niti. Gelatori koji tvore guste gelske mreže često vrlo efikasno geliraju velike količine otapala. Nadalje, TEM mikroskopija je kod svih gelova potvrdila prisutnost gelske mreže koja se sastojala od niti nanometarskih dimenzija različitih promjera i duljine.

Rezultati ispitivanja geliranja hidrogelatora Ac-FFA-NH₂ u ovisnosti o pH pokazali su najefikasnije geliranje pri pH od 5,8 – 7,4, što je potvrdilo njegovu potencijalnu primjenu u fiziološkim sustavima i biomedicini. Hidrogel Ac-FFA-NH₂ odabran je za daljnja ispitivanja kao modelni sustav za primjenu u dostavi cjepiva, te sustav za kontrolirano otpuštanje lijekova.

Priredeni su kompozitni materijali temeljeni na Ac-FFA-NH₂ hidrogelu i liposomima, ispitana gelirajuća svojstva hidrogelatora u prisustvu liposoma, te su dobiveni kompozitni nanomaterijali morfološki okarakterizirani. Nadalje, ispitano je ugrađivanje BSA i FITC-BSA u hidrogel. TEM i fluorescentnom mikroskopijom potvrđeno je ugrađivanje liposoma i ispitivanih proteina u hidrogel čija struktura nije narušena. U uzorcima hidrogela s BSA, gelska mreža ostala je očuvanog integriteta, no uočeno je kako su gelske niti bile tanje i gušće. Nadalje, interakcije peptida i liposoma u kompozitnom hidrogelu peptida Ac-FFA-NH₂ karakterizirane

su DSC i FTIR metodom. Rezultati su pokazali da peptidna vlakna i fosfolipidi u liposomskim vezikulama diskretno međusobno djeluju zadržavajući svoj strukturni integritet unutar kompozitnog gela.

Ugrađivanje antitumorskog lijeka doksorubicina, liposomske formulacije doksorubicina (Myocet) i doksorubicina u PLGA- nanočesticama (PLGA-Dox), pokazan je potencijal hidrogela Ac-FFA-NH₂ u dostavi i kontroliranom otpuštanju lijekova. U biološki relevantnim koncentracijama lijeka, hidrogel zadržava strukturu gela. TEM mikrografijom uočeno je vezanje agregata lijeka i malih molekula na gelske niti.

Rezultati ispitivanja imunostimulacijske aktivnosti *in vivo* peptida Ac-FFA-NH₂, Ac-FFA-OH i Ac-FFβAla-OMe pokazali su da ispitani peptidi pojačavaju antigen-specifičnu imunološku reakciju te također moduliraju njen smjer. Ac-FFA-NH₂ je pokazao uravnoteženo pojačavanje i Th1 i Th2 tipa imunološkog odgovora, što ga čini prikladnim za daljnje istraživanje adjuvantnog sustava za dostavu cjepiva.

Rezultati otpuštanja proteina pokazali su da je otpuštanje BSA iz hidrogela koji sadrži BSA-liposomsku formulaciju sporije od otpuštanja slobodnog BSA. Također, otpuštanje lijeka doksorubicina i PLGA-Dox je puno sporije od otpuštanja BSA. Iako je molekula doksorubicina mala, te je bilo za očekivati da će lakše difuzijom prolaziti kroz strukturu gela, velika gustoća niti i čvrstoća hidrogela usporavala je otpuštanje molekula doksorubicina iz hidrogela u pufer.

Ciklodekstrini su ispitani kao antidoti, molekule za brzo uklanjanje toksina aristolohijske kiseline te su pokazali dobra svojstva kao potencijalni sustavi za brzu detoksifikaciju. Vezanje analoga aristolohijske kiseline (ARI) na ds-DNA pokazalo je nekovalentno vezanje, mješovitim, nespecifičnim načinom vezanja, ali s biološki relevantnim afinitetom usporedivim s afinitetom ARI prema BSA. Rezultati UV-Vis, fluorescencijske spektroskopije i ITC pokazali su da toksin ARI tvori inkluzijske komplekse s različitim ciklodekstrinima uključujući klinički korišteni derivat γ-CD: Sugamadeks. Afinitet vezanja ARI-toksina prema CD-ima varirao je ovisno o veličini CD-a i modifikacijama ruba, pri čemu je stabilnost kompleksa ARI/SMX bila 2 puta veća od vezanja ARI na BSA, dobro poznatog prijenosnika malih molekula.

Razlika u konstantama vezanja rokuronija/SMX kompleksa ($K_s = 1,8 \times 10^7 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$) i ARIfluo/SMX kompleksa ($K_s = 5 \times 10^6 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$) mogla bi se pripisati dodatnoj elektrostatskoj interakciji između pozitivno nabijenog rokuronija i negativno nabijenog SMX-a, koji nije mogao biti formiran s neutralnim ARIfluo. Međutim, čini se da su hidrofobne i van

der Waalsove interakcije ARI-ja ili rokuronija sa SMX-om usporedive. To potvrđuju studije molekularnog modeliranja, prikazujući strukture s najnižom energijom za kompleks ARI/SMX gdje su karboksilne skupine ARI-ja izložene vodi, i gdje je kondenzirani aromatski dio ARI duboko uronjen u šupljinu CD-a. Ovi su rezultati dokaz koncepta da bi se Sugamadeks, slično kao što ekstrahira neuromuskularne relaksatore (npr. vekuronij ili rokuronij) iz krvi i time zaustavlja njihovu bioaktivnost, mogao koristiti kao prva pomoć nakon akutne intoksikacije s ARI. U konkurenciji sa BSA ili DNA, Sugamadeks bi vezanjem većeg dijela ARI u krvi značajno smanjio njegovu apsorpciju i posljedičnu toksičnu biotransformaciju u organizmu.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

A – alanin

A – apsorbancija

Ac – acetilna skupina

AFM – engl. *Atomic Force Microscopy* (spektroskopija atomskih sila)

Ala - alanin

APP – amiloid-prekursorski protein

ARI– aristolohijska kiselina I

ARIflo - Fluorescentni derivat aristolohijske kiseline I

A β – amiloid- β protein

Boc – *tert*-butiloksikarbonilna zaštitna skupina

bs – engl. *broad singlet* (prošireni singlet)

BSA – engl. *bovine serum albumin* (goveđi serum albumina)

CD – engl. *circular dichroism spectroscopy* (spektroskopija cirkularnog dikroizma)

COSY – engl. *correlation spectroscopy*

ct-DNA – engl. *calf thymus*-DNA (DNA iz telećeg timusa)

d – dublet u NMR spektroskopiji

DCC – *N,N'*-dicikloheksilkarbodiimid

DCHU – *N,N'*-dicikloheksilurea

dd – dublet dubleta u NMR spektroskopiji

DIPEA – *N,N'*-diizopropiletilamin

DMAP – 4-dimetilaminopiridin

DMF – *N,N*-dimetilformamid

DMSO – dimetilsulfoksid

DNA – engl. *deoxyribonucleic acid* (deoksiribonukleinska kiselina)

ds-DNA – dvolančana DNA

dt – dublet tripleta u NMR spektroskopiji

EDC - 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid

EtOAc – etil-acetat

EtOH – etanol

F – fenilalanin

FDA – engl. *Food and Drug Administration* (Američka agencija za hranu i lijekove)

FITC-BSA – fluorescein izotiocijanat goveđeg seruma albumina

Fmoc – fluorenilmetiloksikarbonilna zaštitna skupina

FTIR – engl. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (Fourierova transformacija infracrvene spektroskopije)

HOBt – 1-hidroksibenzotriazol

I – ionska jakost

ITC – engl. *Isothermal Titration Calorimetry* (izotermna titracijska kalorimetrija)

K_s – konstanta stabilnosti kompleksa

MDP – muramil dipeptid

MeCN – acetonitril (CH_3CN)

MeOH – metanol

Mili-Q – Mili-Q voda (ultračista voda)

Myocet – DOX ugrađen u liposome

NMR – engl. *Nuclear Magnetic Resonance* (nuklearna magnetska rezonancija)

NOESY – engl. *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*

OPD - *o*-fenilendiamindihidroklorida

PBS – engl. *phosphate-buffered saline* (fosfatni pufer)

Ph – fenilna skupina

Phe - fenilalanin

PLGA-Dox – DOX inkapsuliran u nanočestice polilaktilglikolne kiseline

pWk – kalijeva sol fosfovolframske kiseline

q – kvartet u NMR spektroskopiji

s – singlet u NMR spektroskopiji

SANS – engl. *Small-Angle Neutron Scattering* (spektroskopija neutronske raspršenja pod malim kutem)

SAXS – engl. *Small-Angle X-ray Scattering* (spektroskopija rendgenske raspršenja pod malim kutem)

SEM – pretražna elektronska mikroskopija

SMX – engl. *Suggamadex* (derivat gama ciklodekstrina)

T - temperatura

t – triplet u NMR spektroskopiji

t.t. – temperatura tališta

TEM – engl. *transmission electron spectroscopy* (transmisijska elektronska spektroskopija)

TFA – engl. *trifluoroacetic acid* (trifluoroctena kiselina)

THF – tetrahidrofuran

ThT – tioflavin T

TLC – engl. *Thin Layer Chromatography* (tankoslojna kromatografija)

T_m – temperatura mekšanja

TMS – tetrametilsilan

T_p – temperatura pretprijelaza

UV-Vis – engl. *ultraviolet-visible* (ultraljubičasto-vidljivo elektromagnetsko zračenje)

WHO – engl. *World Health Organisation* (Svjetska zdravstvena organizacija)

XRD – engl. *X-ray Diffraction* (spektroskopija rendgenske difrakcije)

XRS – engl. *X-ray Scattering* (spektroskopija rendgenskog raspršenja)

α -CD – alfa ciklodekstrin

β -CD – beta ciklodekstrin

γ -CD – gama ciklodekstrin

δ – oznaka za kemijski pomak u NMR spektroskopiji

$\Delta_r G$ – promjena gibsove energije

$\Delta_r H$ – promjena entalpije

$\Delta_r S$ – promjena entropije

ΔT_m – promjena temperature mekšanja

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. J. A. Kitchen, P. A. Gale In *Chirality in Supramolecular Assemblies: Causes and Consequences*; F. R. Keene, Ed.; 2017 John Wiley & Sons, Ltd: (2016).
2. J. K. Patra, G. Das, L. F. Fraceto, E. V. R. Campos, M. D. P. Rodriguez-Torres, L. S. Acosta-Torres et al. H. S. Shin, *J Nanobiotechnology* **16** (2018) 71.
3. S. Catrouillet, L. Bouteiller, E. Nicol, T. Nicolai, S. Pensec, B. Jacquette et al. O. Colombani, *Macromolecules* **48** (2015) 1364–1370.
4. G. Fichman, E. Gazit, *Acta Biomater* **10** (2014) 1671–1682.
5. H. Lee, H. Park, D. Y. Ryu, W. D. Jang, *Chemical Society reviews* **52** (2023) 1947–1974.
6. L. Frkanec, M. Zinic, *Chem Commun (Camb)* **46** (2010) 522–537.
7. T. Gregoric, J. Makarevic, Z. Stefanic, M. Zinic, L. Frkanec, *Polymers (Basel)* **14** (2022).
8. C. J. C. Edwards-Gayle, I. W. Hamley, *Org Biomol Chem* **15** (2017) 5867–5876.
9. S. La Manna, C. Di Natale, V. Onesto, D. Marasco, *International journal of molecular sciences* **22** (2021).
10. E. K. Johnson, D. J. Adams, P. J. Cameron, *J. Mater. Chem.* **21** (2011) 2024–2027.
11. M. J. Krysmann, V. Castelletto, A. Kelarakis, I. W. Hamley, R. A. Hule, D. J. Pochan, *Biochemistry* **47** (2008) 4597–4605.
12. X. Liu, Q. Jiang, Y. Yin, G. Liang, *Chem & Bio Engineering* **1** (2024) 664–677.
13. X. Yan, P. Zhu, J. Li, *Chemical Society reviews* **39** (2010) 1877–1890.
14. W. T. Truong, Y. Su, D. Gloria, F. Braet, P. Thordarson, *Biomaterials science* **3** (2015) 298–307.
15. S. M. Hsu, Y. C. Lin, J. W. Chang, Y. H. Liu, H. C. Lin, *Angewandte Chemie* **53** (2014) 1921–1927.
16. M. Biancalana, S. Koide, *Biochim Biophys Acta* **1804** (2010) 1405–1412.
17. T. Smidlehner, H. Bonnet, S. Chierici, I. Piantanida, *Bioorganic chemistry* **104** (2020) 104196.
18. M. Criado-Gonzalez, E. Espinosa-Cano, L. Rojo, F. Boulmedais, M. R. Aguilar, R. Hernandez, *ACS Appl Mater Interfaces* **14** (2022) 10068–10080.
19. G. Duché, C. Heu, P. Thordarson, *ACS Applied Nano Materials* **6** (2023) 14745–14755.
20. E. Gallo, C. Diaferia, E. Rosa, G. Smaldone, G. Morelli, A. Accardo, *International journal of nanomedicine* **16** (2021) 1617–1630.
21. J. Boekhoven, A. M. Brizard, M. C. A. Stuart, L. Florusse, G. Raffy, A. Del Guerso, J. H. van Esch, *Chem Sci* **7** (2016) 6021–6031.
22. T. Pospisil, L. Ferhatovic Hamzic, L. Brkic Ahmed, M. Lovric, S. Gajovic, L. Frkanec, *Biomaterials science* **4** (2016) 1412–1416.
23. R. Ischakov, L. Adler-Abramovich, L. Buzhansky, T. Shekhter, E. Gazit, *Bioorg Med Chem* **21** (2013) 3517–3522.
24. K. Elkhoury, P. Kocak, A. Kang, E. Arab-Tehrany, J. Ellis Ward, S. R. Shin, *Pharmaceutics* **12** (2020).
25. N. C. Wickremasinghe, V. A. Kumar, J. D. Hartgerink, *Biomacromolecules* **15** (2014) 3587–3595.
26. S. Grijalvo, J. Mayr, R. Eritja, D. D. Diaz, *Biomaterials science* **4** (2016) 555–574.

27. M. M. Ibrahim, A. B. Nair, B. E. Aldhubiab, T. M. Shehata, (2017).
 28. Y. Wang, Z. Xu, M. Lovrak, V. A. A. le Sage, K. Zhang, X. Guo et al. J. H. van Esch, *Angewandte Chemie* **59** (2020) 4830–4834.
 29. M. W. Joraholmen, M. Johannessen, K. Gravningen, M. Puolakkainen, G. Acharya, P. Basnet, N. Skalko-Basnet, *Pharmaceutics* **12** (2020).
 30. T. L. Lopez-Silva, D. G. Leach, A. Azares, I. C. Li, D. G. Woodside, J. D. Hartgerink, *Biomaterials* **231** (2020) 119667.
 31. E. C. Gale, A. E. Powell, G. A. Roth, E. L. Meany, J. Yan, B. S. Ouet al. E. A. Appel, *Advanced materials* **33** (2021) e2104362.
 32. N. Falcone, M. Ermis, D. G. Tamay, M. Mecwan, M. Monirizad, T. G. Matheset al. A. Khademhosseini, *Adv Healthc Mater* **12** (2023) e2301096.
 33. A. Kasprzak, M. Koszytkowska-Stawinska, A. M. Nowicka, W. Buchowicz, M. Poplawska, *J Org Chem* **84** (2019) 15900–15914.
 34. J. Jin, L. Cai, Y. G. Jia, S. Liu, Y. Chen, L. Ren, *J Mater Chem B* **7** (2019) 1637–1651.
 35. M. Sayed, H. Pal, *Physical chemistry chemical physics : PCCP* **23** (2021) 26085–26107.
 36. H. Yin, D. Bardelang, R. Wang, *Trends in Chemistry* **3** (2021) 1–4.
 37. G. W. Gokel, L. Barbour, J. L. Atwood *Comprehensive Supramolecular Chemistry II*; Elsevier Science: (2017).
 38. J. W. Steed, J. L. Atwood *Supramolecular Chemistry*; 2nd Edition ed.; Wiley: United Kingdom (2009), p 27.
 39. J. L. Atwood *Comprehensive Supramolecular Chemistry II*; Second Edition ed.; Elsevier: United States (2017), p 435–457.
 40. J. W. Steed, J. L. Atwood *Supramolecular Chemistry*; 2nd Edition ed.; Wiley: United Kingdom (2009), p 106.
 41. J. W. Steed, J. L. Atwood *Supramolecular Chemistry*; 2nd Edition ed.; Wiley: United Kingdom (2009), p 86.
 42. E. Mattia, S. Otto, *Nat Nanotechnol* **10** (2015) 111–119.
 43. E. R. Triboni, T. B. F. Moraes, M. J. Politi, (2019) 35–69.
 44. D. Pochan, O. Scherman, *Chemical reviews* **121** (2021) 13699–13700.
 45. D. Chandler, *Nature* **437** (2005) 640–647.
 46. J. W. Steed, J. L. Atwood *Supramolecular Chemistry*; 2nd Edition ed.; Wiley: United Kingdom (2009), p 595–596.
 47. S. Yang, Y. Yan, J. Huang, A. V. Petukhov, L. M. J. Kroon-Batenburg, M. Drechsler et al. L. Jiang, *Nature Communications* **8** (2017).
 48. S. Banerjee, R. K. Das, U. Maitra, *Journal of Materials Chemistry* **19** (2009).
 49. J. Zhang, Y. Hu, Y. Li *Gel Chemistry: Interactions, Structures and Properties*; Springer Singapore: (2018).
 50. P. Terech, R. G. Weiss, *Chemical reviews* **97** (1997) 3133–3160.
 51. E. R. Triboni, T. B. F. Moraes, M. J. Politi, (2019) 35–69.
 52. Y. E. Shapiro, *Progress in Polymer Science* **36** (2011) 1184–1253.
 53. G. Yu, X. Yan, C. Han, F. Huang, *Chemical Society reviews* **42** (2013) 6697–6722.
 54. R. G. Weiss, P. Terech; Springer: (2006).
 55. P. Dastidar, *Chemical Society reviews* **37** (2008) 2699–2715.
 56. A. R. Hirst, B. Escuder, J. F. Miravet, D. K. Smith, *Angewandte Chemie* **47** (2008) 8002–8018.
 57. K. J. Skilling, F. Citossi, T. D. Bradshaw, M. Ashford, B. Kellam, M. Marlow, *Soft matter* **10** (2014) 237–256.
-

58. P. S. Gahlaut, D. Gautam, K. Yadav, B. Jana, *Journal of Molecular Structure* **1272** (2023).
59. D. K. Smith, *Soft matter* **20** (2023) 10–70.
60. E. M. Ahmed, *Journal of advanced research* **6** (2015) 105–121.
61. W. Zhao, X. Jin, Y. Cong, Y. Liu, J. Fu, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **88** (2012) 327–339.
62. J. Shin, P. V. Braun, W. Lee, *Sensors and Actuators B: Chemical* **150** (2010) 183–190.
63. S. Chen, Y. Fan, J. Song, B. Xue, *Materials Today Chemistry* **23** (2022).
64. J. Skopinska-Wisniewska, S. De la Flor, J. Kozłowska, *International journal of molecular sciences* **22** (2021).
65. F. Seifi, F. Haghighat, H. Nikraves, Y. Kazemzadeh, R. Azin, S. Osfouri, *Journal of Petroleum Exploration and Production Technology* **14** (2024) 2617–2655.
66. B. Escuder, L. L. M. J. F. Miravet, *J Org Chem* **71** (2006) 7747–7752.
67. R. Chevigny, E. D. Sitsanidis, J. Schirmer, E. Hulkko, P. Myllyperkio, M. Nissinen, M. Pettersson, *Chemistry* **29** (2023) e202300155.
68. F. Rodriguez-Llansola, J. F. Miravet, B. Escuder, *Chem Commun (Camb)* (2009) 209–211.
69. J. Shi, Y. Gao, Z. Yang, B. Xu, *Beilstein journal of organic chemistry* **7** (2011) 167–172.
70. E. Parisi, A. M. Garcia, D. Marson, P. Posocco, S. Marchesan, *Gels* **5** (2019).
71. N. M. Sangeetha, U. Maitra, *Chemical Society reviews* **34** (2005) 821–836.
72. B. R. Denzer, R. J. Kulchar, R. B. Huang, J. Patterson, *Gels* **7** (2021).
73. S. R. Maloy, K. Hughes, (2013).
74. <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=2289>, (30.6.2020)
75. <https://chemistrytalk.org/amino-acid-chart/>, (13.1.2025.)
76. R. V. Ulijn, A. M. Smith, *Chemical Society reviews* **37** (2008) 664–675.
77. L. Song, L. Yang, J. Meng, S. Yang, *J Phys Chem Lett* **8** (2017) 347–351.
78. <https://proteinstrutures.com/sequence/amino-acids/>, (8.1.2025.)
79. J. D. Sharer, (2014) 136–147.
80. M. A. Sequeira, M. G. Herrera, V. I. Dodero, *Physical chemistry chemical physics : PCCP* **21** (2019) 11916–11923.
81. S. Bera, S. Mondal, S. Rencus-Lazar, E. Gazit, *Accounts of chemical research* **51** (2018) 2187–2197.
82. W.-P. Hsu, K.-K. Koo, A. S. Myerson, *Chemical Engineering Communications* **189** (2010) 1079–1090.
83. R. Otter, N. A. Henke, C. Berac, T. Bauer, M. Barz, S. Seiffert, P. Besenius, *Macromolecular rapid communications* **39** (2018) e1800459.
84. V. Singh, K. Snigdha, C. Singh, N. Sinha, A. K. Thakur, *Soft matter* **11** (2015) 5353–5364.
85. H. Liu, Z. Duan, J. Tang, Q. Lv, M. Rong, R. Lai, *FEBS J* **281** (2014) 4633–4643.
86. N. C. Carrejo, A. N. Moore, T. L. Lopez Silva, D. G. Leach, I. C. Li, D. R. Walker, J. D. Hartgerink, *ACS biomaterials science & engineering* **4** (2018) 1386–1396.
87. <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates>, (5.2.2025.)
88. I. W. Hamley, *Angewandte Chemie* **46** (2007) 8128–8147.
89. R. N. Rambaran, L. C. Serpell, *Prion* **2** (2008) 112–117.
90. G. G. Glenner, D. Ein, E. D. Eanes, H. A. Bladen, W. Terry, D. L. Page, *Science* **174** (1971) 712–714.
-

91. D. J. Selkoe, *Physiol Rev* **81** (2001) 741–766.
 92. M. P. Murphy, H. LeVine, 3rd, *J Alzheimers Dis* **19** (2010) 311–323.
 93. https://en.wikipedia.org/wiki/Amyloid_beta, (5.2.2025.)
 94. N. I. Mansor, C. M. Ntimi, N. M. Abdul-Aziz, K. H. Ling, A. Adam, R. Rosli et al. N. Nordin, *Bosn J Basic Med Sci* **21** (2021) 98–110.
 95. M. D. Benson, J. N. Buxbaum, D. S. Eisenberg, G. Merlini, M. J. M. Saraiva, Y. Sekijima et al. P. Westermarck, *Amyloid* **25** (2018) 215–219.
 96. C. Xue, T. Y. Lin, D. Chang, Z. Guo, *R Soc Open Sci* **4** (2017) 160696.
 97. K. Gade Malmos, L. M. Blancas-Mejia, B. Weber, J. Buchner, M. Ramirez-Alvarado, H. Naiki, D. Otzen, *Amyloid* **24** (2017) 1–16.
 98. T. Smidlehner, I. Piantanida, G. Pescitelli, *Beilstein journal of organic chemistry* **14** (2018) 84–105.
 99. L. Rejc, D. Knez, G. Molina-Aguirre, A. Espargaro, J. Kladnik, A. Medenet et al. J. Kosmrlj, *Biomed Pharmacother* **175** (2024) 116616.
 100. Z. Y. Zhang, Z. J. Li, Y. H. Tang, L. Xu, D. T. Zhang, T. Y. Qin, Y. L. Wang, *Biosensors (Basel)* **13** (2023).
 101. S. Tzotzos, A. J. Doig, *Protein Sci* **19** (2010) 327–348.
 102. E. Gazit, *FEBS J* **272** (2005) 5971–5978.
 103. D. B. Teplow, *Amyloid* **5** (1998) 121–142.
 104. L. C. Serpell, *Biochim Biophys Acta* **1502** (2000) 16–30.
 105. C. Hilbich, B. Kisters-Woike, J. Reed, C. L. Masters, K. Beyreuther, *J Mol Biol* **228** (1992) 460–473.
 106. T. Smidlehner, H. Bonnet, S. Chierici, I. Piantanida, *Bioorg Chem* **104** (2020) 104196.
 107. S. Marchesan, A. V. Vargiu, K. E. Styan, *Molecules* **20** (2015) 19775–19788.
 108. M. Reches, E. Gazit, *Science* **300** (2003) 625–627.
 109. E. A. Meyer, R. K. Castellano, F. Diederich, *Angewandte Chemie* **42** (2003) 1210–1250.
 110. C. Guo, Y. Luo, R. Zhou, G. Wei, *ACS Nano* **6** (2012) 3907–3918.
 111. R. Contreras-Montoya, A. B. Bonhome-Espinosa, A. Orte, D. Miguel, J. M. Delgado-López, J. D. G. Duran et al. L. Álvarez de Cienfuegos, *Materials Chemistry Frontiers* **2** (2018) 686–699.
 112. C. Liang, L. Zhang, W. Zhao, L. Xu, Y. Chen, J. Long et al. Z. Yang, *Adv Healthc Mater* **7** (2018) e1800899.
 113. D. Jia, S. Li, M. Jiang, Z. Lv, H. Wang, Z. Zheng, *ACS Appl Mater Interfaces* **16** (2024) 15752–15760.
 114. G. Gao, Y. W. Jiang, W. Zhan, X. Liu, R. Tang, X. Sun et al. G. Liang, *J Am Chem Soc* **144** (2022) 11897–11910.
 115. X. Cheng, T. Xia, W. Zhan, H. D. Xu, J. Jiang, X. Liu et al. G. Liang, *Adv Healthc Mater* **11** (2022) e2201916.
 116. B. Saikia, D. Chen, Y. de Coene, S. Van Cleuvenbergen, *Gels* **10** (2024).
 117. B. L. Abraham, W. Liyanage, B. L. Nilsson, *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **35** (2019) 14939–14948.
 118. A. Mahler, M. Reches, M. Rechter, S. Cohen, E. Gazit, *Advanced materials* **18** (2006) 1365–1370.
 119. V. Jayawarna, M. Ali, T. A. Jowitt, A. F. Miller, A. Saiani, J. E. Gough, R. V. Ulijn, *Advanced materials* **18** (2006) 611–614.
 120. V. Jayawarna, S. M. Richardson, A. R. Hirst, N. W. Hodson, A. Saiani, J. E. Gough, R. V. Ulijn, *Acta Biomater* **5** (2009) 934–943.
-

121. I. Sahu, Y. Tang, Z. Wang, S. Naskar, T. Vijayakanth, V. V. Adoleet al.P. Chakraborty, *Journal of Materials Chemistry A* **12** (2024) 4169–4183.
 122. S. Takahashi, M. Leiss, M. Moser, T. Ohashi, T. Kitao, D. Heckmann et al.R. Fassler, *J Cell Biol* **178** (2007) 167–178.
 123. K. Richter, R. Egger, G. Kreil, *Science* **238** (1987) 200–202.
 124. A. M. Garcia, D. Iglesias, E. Parisi, K. E. Styan, L. J. Waddington, C. Deganutt et al.S. Marchesan, *Chem* **4** (2018) 1862–1876.
 125. V. Singh, R. K. Rai, A. Arora, N. Sinha, A. K. Thakur, *Scientific reports* **4** (2014) 3875.
 126. C. Ridler, *Nat Rev Neurol* **13** (2017) 128.
 127. A. V. Vargiu, D. Iglesias, K. E. Styan, L. J. Waddington, C. D. Easton, S. Marchesan, *Chem Commun (Camb)* **52** (2016) 5912–5915.
 128. C. G. Marshall, G. Broadhead, B. K. Leskiw, G. D. Wright, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94** (1997) 6480–6483.
 129. Z. Feng, B. Xu, *Biomol Concepts* **7** (2016) 179–187.
 130. J. Sasabe, M. Suzuki, *Keio J Med* **68** (2019) 1–16.
 131. S. Ritz-Timme, I. Laumeier, M. J. Collins, *Br J Dermatol* **149** (2003) 951–959.
 132. L. C. Hsiao, C. H. Lee, K. Mazmanian, M. Yoshida, G. Ito, T. Murata et al.S. D. Hsu, *J Mol Biol* **437** (2025) 169092.
 133. W. Yang, W. Yu, X. Li, X. Li, S. Yu, *Neurobiol Aging* **90** (2020) 24–32.
 134. H. Sakaue, T. Takata, N. Fujii, H. Sasaki, N. Fujii, *Biochim Biophys Acta* **1854** (2015) 1–9.
 135. S. Loic In *Amino Acid - New Insights and Roles in Plant and Animal*; T. A. a. M. Asaduzzaman, Ed. (2017).
 136. M. L. Jagrosse, P. Agredo, B. L. Abraham, E. S. Toriki, B. L. Nilsson, *ACS biomaterials science & engineering* **9** (2023) 784–796.
 137. Y. S. Jo, J. Gantz, J. A. Hubbell, M. P. Lutolf, *Soft matter* **5** (2009) 440–446.
 138. S. R. S. Veloso, V. Gomes, S. L. F. Mendes, L. Hilliou, R. B. Pereira, D. M. Pereira et al.E. M. S. Castanheira, *Soft matter* **18** (2022) 8384–8397.
 139. M. Kurbasic, C. D. Romano, A. M. Garcia, S. Kralj, S. Marchesan, *Gels* **3** (2017).
 140. S. Koutsopoulos, L. D. Unsworth, Y. Nagai, S. Zhang, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106** (2009) 4623–4628.
 141. Y. Zhang, Z. Hu, X. Li, Y. Ding, Z. Zhang, X. Zhan et al.Z. Yang, *Biomaterials science* **10** (2022) 3092–3098.
 142. Y. Han, Y. Jiang, C.-F. Chen, *Tetrahedron* **71** (2015) 503–522.
 143. L. Isaacs, *Chem Commun (Camb)* (2009) 619–629.
 144. R. Nag, C. P. Rao, *Chem Commun (Camb)* **58** (2022) 6044–6063.
 145. P. Jansook, N. Ogawa, T. Loftsson, *Int J Pharm* **535** (2018) 272–284.
 146. M. Marjanovic, M. Kralj, F. Supek, L. Frkanec, I. Piantanida, T. Smuc, L. Tusek-Bozic, *J Med Chem* **50** (2007) 1007–1018.
 147. L. Frkanec, A. Višnjevac, B. Kojić-Prodić, M. Žinić, *Chemistry - A European Journal* **6** (2000) 442–453.
 148. M. Kralj, L. Tusek-Bozic, L. Frkanec, *ChemMedChem* **3** (2008) 1478–1492.
 149. G. Horvat, V. Stilinovic, B. Kaitner, L. Frkanec, V. Tomisic, *Inorg Chem* **52** (2013) 12702–12712.
 150. J. Szejtli, T. Osa *Comprehensive Supramolecular Chemistry, Volume 3*.
 151. J. C. d. Miranda, T. E. A. Martins, F. Veiga, H. G. Ferraz, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* **47** (2011) 665–681.
-

152. B. Rajbanshi, K. Das, D. Roy, S. Saha, M. N. Roy, *Journal of Molecular Liquids* **370** (2023).
153. S. S. Jambhekar, P. Breen, *Drug Discov Today* **21** (2016) 363–368.
154. N. Roy, B. Mahato, D. Roy, K. Das, M. N. Roy, *Zeitschrift für Physikalische Chemie* **235** (2021) 723–744.
155. A. Zwiers, M. van den Heuvel, J. Smeets, S. Rutherford, *Clin Drug Investig* **31** (2011) 101–111.
156. B. G. Poulson, Q. A. Alsulami, A. Sharfalddin, E. F. El Agammy, F. Mouffouk, A.-H. Emwaset al.M. Jaremko, *Polysaccharides* **3** (2021) 1–31.
157. S. V. Kurkov, T. Loftsson, *Int J Pharm* **453** (2013) 167–180.
158. C. J. Stefanovic *Oxford textbook of clinical nephrology* New York: Oxford Univ Press (2005), p 1095–1101.
159. V. M. Arlt, M. Stiborova, H. H. Schmeiser, *Mutagenesis* **17** (2002) 265–277.
160. H. A. Priestap, C. M. van Baren, P. Di Leo Lira, J. D. Coussio, A. L. Bandoni, *Phytochemistry* **63** (2003) 221–225.
161. J. L. Vanherweghem, M. Depierreux, C. Tielemans, D. Abramowicz, M. Dratwa, M. Jadoulet al.et al., *Lancet* **341** (1993) 387–391.
162. B. A. Schwetz, *Jama* **286** (2001) 35.
163. C. Tangtong, L. Qiao, D. T. Long, T. C. Voice, *Aquat Geochem* **26** (2020) 183–190.
164. X. Wu, J. Liu, H. Huang, W. Xue, X. Yao, J. Jin, *International journal of biological macromolecules* **49** (2011) 343–350.
165. V. S. Sidorenko, S. Attaluri, I. Zaitseva, C. R. Iden, K. G. Dickman, F. Johnson, A. P. Grollman, *Carcinogenesis* **35** (2014) 1814–1822.
166. A. P. Grollman, S. Shibutani, M. Moriya, F. Miller, L. Wu, U. Mollet al.B. Jelakovic, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104** (2007) 12129–12134.
167. M. Stiborova, V. M. Arlt, H. H. Schmeiser, *International journal of molecular sciences* **18** (2017).
168. A. Bom, M. Bradley, K. Cameron, J. K. Clark, J. Van Egmond, H. Feilden et al.M. Q. Zhang, *Angewandte Chemie* **41** (2002) 266–270.
169. W. Li, Z. Chen, Y. Liao, H. Liu, *Electrophoresis* **27** (2006) 837–841.
170. L. Guo, H. Yue, Z. Cai, *J Pharm Biomed Anal* **53** (2010) 37–42.
171. C. H. Kuo, C. W. Lee, S. C. Lin, I. L. Tsai, S. S. Lee, Y. J. Tsenget al.L. Wei-Chu, *Talanta* **80** (2010) 1672–1680.
172. H. Gampp, M. Maeder, C. J. Meyer, A. D. Zuberbuhler, *Talanta* **32** (1985) 257–264.
173. <http://www.hyperquad.co.uk/>, (13.10.2025)
174. N. G. Serdar, T. Pospisil, M. Sisic, I. Crnolovac, P. Males, R. Frkanec, L. Frkanec, *Nanoscale Adv* **7** (2025) 4660–4672.
175. T. Pospisil, L. Ferhatovic Hamzic, L. Brkic Ahmed, M. Lovric, S. Gajovic, L. Frkanec, *Biomaterials science* **4** (2016) 1412–1416.
176. O. Keller, W. E. Keller, G. v. Look, G. Wersin, (2003) 160–160.
177. J. Li, Y. Sha, *Molecules* **13** (2008) 1111–1119.
178. J. G. Nathanael, L. F. Gamon, M. Cordes, P. R. Rablen, T. Bally, K. M. Frommet al.U. Wille, *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **19** (2018) 922–926.
179. R. Frkanec, D. Travas, M. Krstanovic, B. H. Spoljar, D. Ljevakovic, B. Vranesic et al.J. Tomasic, *Journal of liposome research* **13** (2003) 279–294.
180. <https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/infrared-and-raman/opus-spectroscopy-software/release-overview.html>, (15.10.2025.)
-

181. M. Maeder, A. D. Zuberbuehler, *Analytical Chemistry* **62** (2002) 2220–2224.
 182. J. L. Mergny, L. Lacroix, *Oligonucleotides* **13** (2003) 515–537.
 183. R. N. Lewis, D. A. Mannock, R. N. McElhaney, *Methods Mol Biol* **400** (2007) 171–195.
 184. M. A. Morini, M. B. Sierra, V. I. Pedroni, L. M. Alarcon, G. A. Appignanesi, E. A. Disalvo, *Colloids Surf B Biointerfaces* **131** (2015) 54–58.
 185. C. Demetzos, *Journal of liposome research* **18** (2008) 159–173.
 186. J. Makarevic, M. Jokic, B. Peric, V. Tomisic, B. Kojic-Prodic, M. Zinic, *Chemistry* **7** (2001) 3328–3341.
 187. M. Ge, J. H. Freed, *Biophys J* **85** (2003) 4023–4040.
 188. A. Garcia, H. Zou, K. R. Hossain, Q. H. Xu, A. Buda, R. J. Clarke, *ACS omega* **4** (2019) 518–527.
 189. C. Vidal Bde, M. L. Mello, *Micron* **42** (2011) 283–289.
 190. M. Foggia, P. Taddei, A. Torreggiani, M. Dettin, A. Tinti, *Proteomics Research Journal* **2** (2012) 231–272.
 191. L. Zhang, X. Song, Q. Qi, W. Liu, *Food Chem* **375** (2022) 131893.
 192. C. Jiang, A. Gamarnik, C. P. Tripp, *The journal of physical chemistry. B* **109** (2005) 4539–4544.
 193. E. Y. Jiang, J. Rieppo, *Journal of Molecular Structure* **799** (2006) 196–203.
 194. P. Chakraborty, M. Ghosh, L. Schnaider, N. Adadi, W. Ji, D. Bychenko et al. E. Gazit, *Macromolecular rapid communications* **40** (2019) e1900175.
 195. R. Oliva, M. Chino, K. Pane, V. Pistorio, A. De Santis, E. Pizzo et al. L. Petraccone, *Scientific reports* **8** (2018) 8888.
 196. Z. Luo, Q. Wu, C. Yang, H. Wang, T. He, Y. Wanget al. Z. Yang, *Advanced materials* **29** (2017).
 197. L. Habjanec, R. Frkanec, B. Halassy, J. Tomasic, *Journal of liposome research* **16** (2006) 1–16.
 198. D. E. S. Stewart-Tull, (1989) 213–226.
 199. Z. Valinger, B. Ladesic, I. Hrsak, J. Tomasic, *International journal of immunopharmacology* **9** (1987) 325–332.
 200. B. Halassy, M. Krstanovic, R. Frkanec, J. Tomasic, *Vaccine* **21** (2003) 971–976.
 201. F. Ellouz, A. Adam, R. Ciorbaru, E. Lederer, *Biochemical and biophysical research communications* **59** (1974) 1317–1325.
 202. J. P. Vasilakos, M. A. Tomai, *Expert review of vaccines* **12** (2013) 809–819.
 203. E. Nanishi, D. J. Dowling, O. Levy, *Current opinion in pediatrics* **32** (2020) 125–138.
 204. E. Ben-Akiva, A. Chapman, T. Mao, D. J. Irvine, *Sci Immunol* **10** (2025) eado5937.
 205. T. Zhao, Y. Cai, Y. Jiang, X. He, Y. Wei, Y. Yu, X. Tian, *Signal Transduct Target Ther* **8** (2023) 283.
 206. M. Brgles, D. Jurasin, M. D. Sikiric, R. Frkanec, J. Tomasic, *Journal of liposome research* **18** (2008) 235–248.
 207. G. Rabbani, M. H. Baig, A. T. Jan, E. Ju Lee, M. V. Khan, M. Zaman et al. I. Choi, *International journal of biological macromolecules* **105** (2017) 1572–1580.
 208. N. Roy, P. Bomzan, M. Nath Roy, *Chemical Physics Letters* **748** (2020).
 209. X. Wu, S. Tang, Z. Wang, X. Ma, L. Zhang, F. Zhanget al. K. Chen, *Vaccines* **10** (2022).
 210. K. B. D.A. Case, I.Y. Ben-Shalom, S.R. Brozell, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham, III, V.W.D. Cruzeiro, R. E. D. T.A. Darden, G. Giambasu, M.K. Gilson, H. Gohlke, A.W. Goetz, R. Harris, S. Izadi, S.A. Izmailov, K. Kasavajhala, A. Kovalenko, R. Krasny, T. Kurtzman, T.S. Lee, S. LeGrand, P. Li, C. Lin, J. Liu, R. L. T. Luchko, V. Man, K.M. Merz, Y. Miao, O.
-

- Mikhailovskii, G. Monard, H. Nguyen, A. Onufriev, F., S. P. Pan, R. Qi, D.R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, S. Schott-Verdugo, J. Shen, C.L. Simmerling, N.R., J. S. Skrynnikov, J. Swails, R.C. Walker, J. Wang, L. Wilson, R.M. Wolf, X. Wu, Y. Xiong, Y. Xue,, D. M. Y. a. P. A. Kollman, *AMBER 2020*, (2020),
211. D. Vasetti, M. Pagliai, P. Procacci, *J Chem Theory Comput* **15** (2019) 1983–1995.
212. D. J. Price, C. L. Brooks, 3rd, *The Journal of chemical physics* **121** (2004) 10096–10103.
213. N. Goga, A. J. Rzepiela, A. H. de Vries, S. J. Marrink, H. J. Berendsen, *J Chem Theory Comput* **8** (2012) 3637–3649.
214. H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, A. DiNola, J. R. Haak, *The Journal of chemical physics* **81** (1984) 3684–3690.
215. T. Darden, D. York, L. Pedersen, *The Journal of chemical physics* **98** (1993) 10089–10092.
216. D. W. Schrödinger L, *PyMOL*, (2020),
217. J. D. McGhee, P. H. von Hippel, *J Mol Biol* **86** (1974) 469–489.
218. M. Demeunynck, C. Bailly, W. Wilson *Small molecule DNA and RNA binders: from synthesis to nucleic acid complexes*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: (2004).
219. M. Eriksson, B. Norden, *Methods in enzymology* **340** (2001) 68–98.
-

§ 8. DODATAK

POPIS SLIKA

Slika 1. Samoudruživanje molekula u supramolekulske strukture a) lipidi, b) proteini, c) ciklodekstrinski kompleks (ilustracija preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru). ⁴⁷	26
Slika 2. Molekulsko samoudruživanje od otopine do 3D mreže (ilustracija preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru). ^{43,51}	27
Slika 3. Klasifikacija gelova prema prirodi gelatora, vrsti interakcija te vrsti molekule gelatora (ilustracija preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru). ⁴⁹	27
Slika 4. Stvaranje gela (ilustracija preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru). ⁵³	28
Slika 5. Tipovi sustava za ciljanu dostavu lijekova: 1.- supramolekulski gelovi, 2.- kovalentno vezanje na nosače s enzimskim otpuštanjem, 3.- kovalentno vezanje na intermedijarne prolijekove i enzimski inducirano samoudruživanje (ilustracija preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru). ⁵⁷	28
Slika 6. Vanjski podražaji koji utječu na bubrenje/skupljanje hidrogelova (ilustracija preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru). ⁶²	29
Slika 7. Postupak nastajanja gela fizičkim procesom (a) i inverzni test (b) (ilustracija preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru). ⁶⁵	31
Slika 8. a) Fischerova projekcija aminokiseline, b) Prirodnih 21 aminokiselina koje se najčešće pojavljuju. ^{74,75}	33
Slika 9. Primjer supramolekulskih peptidnih struktura nastalih molekulskim samoudruživanjem (ilustracija preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru). ⁸	35
Slika 10. Prikaz β -nabranih ploča amiloidnih fibrila. ¹⁶	36
Slika 11. a) Shematski prikaz cijepanja amiloid-prekursorskog proteina do amiloid- β peptida (ilustracija preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru). ⁹³ b) Morfologija amiloid beta (A β) fibrila pod transmisijskim elektronskim mikroskopom. ⁹⁴	37
Slika 12. a) Kemijska struktura tioflavina T i rotacija dvaju dijelova tioflavina T oko C–C veze; b) Karakteristično povećanje fluorescencije tioflavina T pri vezanju na amiloidne niti. ¹⁶	38
Slika 13. Struktura acetyl- τ deriviranog heksapeptida za ispitivanje amiloidne agregacije Ac-Val-Gln-Ile-Val-Tyr-Lys-NH ₂ (AcPHF6).	39

Slika 14. Tipovi nanostruktura Phe-Phe (FF) dipeptida nastalih samoudruživanjem (ilustracija preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru). ¹⁰⁷	40
Slika 15. Strategija razvoja hidrogelova temeljenih na FF i njihova biomedicinska primjena (kratice u shemi: BMP-2, koštani morfogenetski protein-2; CUR, kurkumin; Dexp, deksametazon natrijev fosfat; DOX, doksorubicin; SAB, salvianolna kiselina B; SDF-1, faktor-1 izveden iz stromalnih stanica; Nap, 2-naftiloctena kiselina; Fmoc, 9-fluorenilmetiloksikarbonil; Gly, glicin; D(Thi), asparaginska kiselina funkcionalizirana tiazolidinonom; IEFD, izoleucin-glutaminska kiselina-fenilalanin-asparaginska kiselina; CRB, klorambucil; IDM, indometacin) (ilustracija preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru). ¹²	42
Slika 16. A) Molekulske strukture L- i D-aminokiseline, B) primjeri kemijskih struktura peptida s L- i D-aminokiselinama koji formiraju hidrogel. ¹³⁵	44
Slika 17. Inkluzijski kompleks ciklodekstrina i aktivne molekule.....	47
Slika 18. Ciklodekstrini: a) α -ciklodekstrin b) β -ciklodekstrin, c) (2-hidroksipropil)- β -ciklodekstrin, d) γ -ciklodekstrin, e) Sugamadeks.	48
Slika 19. Shematski prikaz formiranja inkluzijskog kompleksa molekule lijeka i ciklodekstrina u omjeru 1 : 1 (A) i omjeru 1 : 2 (B) (ilustracija preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru). ¹⁴⁵	48
Slika 20. Strukturni prikaz β -ciklodekstrina (β -CD) i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina (HP- β -CD) (ilustracija preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru). ¹⁵⁴	49
Slika 21. Primjeri malih molekula koje se vežu u makrocikličke spojeve (ilustracija preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru). ³⁶	50
Slika 22. (a) Strukturna sličnost aristolohijske kiseline (ARI, crveno) i neuromuskulatoorno blokirajućeg agensa (Rokuronija, crno), (b) Rokuronij u kompleksu s modificiranim γ -ciklodekstrin - Sugammadex (SMX) ¹⁷¹ , (c) ARI i ARIflo ¹⁷² strukture, (d) Shematski prikaz α -, β -, γ - veličina ciklodekstrina.	52
Slika 23. Utjecaj pH na geliranje peptida Ac-FFA-NH ₂ ; s lijeva na desno pH 5, 6, 7, 8.	84
Slika 24. Ac-FFA-NH ₂ hidrogel s PLGA-Dox ($c = 6,89 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) (lijevo) i Myocet ($c = 6,89 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) (desno) u 1 mL vode.	88
Slika 25. TEM gela 6 u H ₂ O (sjenčano s Pt).	89
Slika 26. TEM gela 7 u H ₂ O.	89
Slika 27. TEM gela 6 u acetonitrilu (sjenčano s Pwk).	90

Slika 28. TEM gela 7 u acetonitrilu (sjenčano s Pd).....	90
Slika 29. TEM gela 7 u metanolu (sjenčano s Pd).	91
Slika 30. TEM gela 7 u etanolu (sjenčano s Pd).	91
Slika 31. TEM gela 12 u H ₂ O.	92
Slika 32. TEM gela 13 u acetonitrilu.	92
Slika 33. TEM gela 9 u metanolu.....	93
Slika 34. TEM gela 9 u etanolu.....	93
Slika 35. TEM gela 14 u etanolu.....	93
Slika 36. TEM gela 14 u acetonitrilu.	94
Slika 37. TEM mikrograf hidrogela (a) 0,4 % w/v Ac-FFA-NH ₂ u vodi, pWk sjenčano, (b) s liposomima 5:1 molarni omjer, Pd sjenčano, (c) s liposomomima 5:1 omjer, pWk sjenčano; povećanje 8000x. Skala = 1 µm. (d) s BSA; (e) s liposomskom BSA formulacijom; pWk sjenčano; povećanje 16000x. Skala = 1 µm.	96
Slika 38. Konfokalna fluorescentna mikroskopija kompozita hidrogela 0,4 % w/v Ac-FFA-NH ₂ u vodi: A) s tioflavin T-om, skala = 25 µm; B) s FITC-BSA, skala = 50 µm; C) s liposomskom FITC-BSA formulacijom, skala = 5 µm (strelicama označene liposomske formulacije).	97
Slika 39. AFM hidrogela (a) 0,4 % w/v Ac-FFA-NH ₂ u vodi, (b) s liposomima 1:5 molarni omjer (roza boja – tinjac, smeđe-zeleno – hidrogel niti, tamno-smeđe – liposomi).	98
Slika 40. a) DSC termogram DPPC i Ac-FFA-NH ₂ :DPPC u omjeru 2,5:1. b) DSC termogram DMPC i Ac-FFA-NH ₂ :DMPC u omjeru 2,5:1 (sve vrijednosti su korigirane oduzimanjem bazne linije).	100
Slika 41. Prikaz predloženih interakcija liposoma i hidrogela Ac-FFA-NH ₂	102
Slika 42. Normalizirani FTIR spektri: zeleno (Ac-FFA-NH ₂), plavo (DPPC multilamelarni hidrirani s D ₂ O), narančasto (DPPC+Ac-FFA-NH ₂ smjesa).	103
Slika 43. Normalizirani FTIR spektari: a) područje istezanja skupine CH ₂ - zeleno (Ac-FFA-NH ₂), plavo (DPPC multilamelarni hidratizirani s D ₂ O), narančasti (DPPC+Ac-FFA-NH ₂ smjesa). b) amid vrpce νC=O i amid I i II – zeleno (Ac-FFA-NH ₂), plavo (DPPC multilamelarni hidratizirani s D ₂ O), narančasti (DPPC+Ac-FFA-NH ₂ smjesa). Vertikalne linije prikazuju maksimum vrpca.	104
Slika 44. TEM mikrograf hidrogela (a) 0,4 % w/v Ac-FFA-NH ₂ s Myocetom, (b) s PLGA-Dox; pWk sjenčano; povećanje 16000x. Skala = 500 nm.....	105

Slika 45. Utjecaj adjuvanata na proizvodnju ukupnog anti-OVA IgGs u miševima; Eksperimentalne skupine: 1-OVA; 2-OVA+liposomi; 3-OVA+PGM; 4-OVA+MDP; 5-OVA+Imiquimod; 6-OVA+ Ac-FFA-NH ₂ ; 7-OVA+Ac-FFβA-OMe; 8-OVA+Ac-FFA-OH; * <i>p</i> < 0.05 u usporedbi sa skupinom povezanom isprekidanim linijama.	108
Slika 46. Utjecaj adjuvanata na proizvodnju imunoglobulina u miševima: a) anti-OVA IgG1; b) anti-OVA IgG2a; Eksperimentalne skupine: 1-OVA; 2-OVA+liposomi; 3-OVA+PGM; 4-OVA+MDP; 5-OVA+Imiquimod; 6-OVA+ Ac-FFA-NH ₂ ; 7-OVA+Ac-FFβA-OMe; 8-OVA+Ac-FFA-OH; * <i>p</i> < 0.05 u usporedbi sa skupinom povezanom isprekidanim linijama.	109
Slika 47. Omjer IgG1/IgG2a. Eksperimentalne skupine: 1-OVA; 2-OVA+liposomi; 3-OVA+PGM; 4-OVA+MDP; 5-OVA+Imiquimod; 6-OVA+ Ac-FFA-NH ₂ ; 7-OVA+Ac-FFβA-OMe; 8-OVA+Ac-FFA-OH.	110
Slika 48. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji Ac-FFA-NH ₂ ; molarni apsorpcijski koeficijent (ϵ) pri 257 nm iznosi 442,42 mol ⁻¹ dm ³ cm ⁻¹ ; Korelacijski koeficijenti za sve podatke (crvene linije) iznosi <i>R</i> > 0,999.....	111
Slika 49. a) Promjene apsorpcijskog spektra gelatora Ac-FFA-NH ₂ u fosfatnom puferu pH 7,4 zbog otpuštanja samog gelatora, umetak: koncentracijski profil otpuštanja gelatora u vremenu od 24 h; b) postotak otpuštanja gelatora u vremenu od 24 h.....	112
Slika 50. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji BSA; molarni apsorpcijski koeficijent (ϵ) pri 277 nm iznosi 40831,97 mol ⁻¹ dm ³ cm ⁻¹ . Korelacijski koeficijenti za podatke (crvene linije) iznosi <i>R</i> > 0,996.	113
Slika 51. a) Promjene apsorpcijskog spektra gelatora Ac-FFA-NH ₂ u fosfatnom puferu pH 7,4 zbog otpuštanja BSA, umetak: koncentracijski profil otpuštanja gelatora i BSA u vremenu od 24 h; b) postotak otpuštanja BSA u vremenu 24 h; c) postotak otpuštanja gelatora u vremenu 24 h.....	114
Slika 52. Kinetika otpuštanja BSA i BSA-u liposomima iz hidrogela Ac-FFA-NH ₂	115
Slika 53. Baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji DOX; molarni apsorpcijski koeficijent (ϵ) pri 500 nm iznosi 12540,24 mol ⁻¹ dm ³ cm ⁻¹ . Korelacijski koeficijenti za sve podatke (crvene linije) iznosi <i>R</i> > 0,999.	116
Slika 54. a) Promjene apsorpcijskog spektra gelatora Ac-FFA-NH ₂ u fosfatnom puferu pH 7,4 zbog otpuštanja DOX, umetak: koncentracijski profil otpuštanja gelatora i DOX u vremenu od	

24 h; b) postotak otpuštanja DOX u vremenu od 24 h; c) postotak otpuštanja gelatora u vremenu od 24 h.	117
Slika 55. Baždarni dijagram ovisnosti apsorpcije o koncentraciji DOX u liposomima (Myocet); molarni apsorpcijski koeficijent (ϵ) pri 500 nm iznosi $670,15 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$. Korelacijski koeficijenti za sve podatke (crvene linije) iznosi $R > 0,985$	118
Slika 56. a) Promjene apsorpcijskog spektra gelatora Ac-FFA-NH ₂ u fosfatnom puferu pH 7,4 zbog otpuštanja DOX iz liposoma, umetak: koncentracijski profil otpuštanja gelatora i DOX iz liposoma u vremenu od 24 h; b) postotak otpuštanja DOX iz liposoma u vremenu od 24 h; c) postotak otpuštanja gelatora u vremenu od 24 h.	119
Slika 57. Baždarni dijagram ovisnosti apsorpcije o koncentraciji DOX iz PLGA-Dox; molarni apsorpcijski koeficijent (ϵ) pri 500 nm iznosi $19395,92 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$. Korelacijski koeficijenti za sve podatke (crvene linije) iznosi $R > 0,997$	120
Slika 58. a) Promjene apsorpcijskog spektra gelatora Ac-FFA-NH ₂ u fosfatnom puferu pH 7,4 zbog otpuštanja DOX iz PLGA-Dox, umetak: koncentracijski profil otpuštanja gelatora i DOX iz PLGA-Dox u vremenu od 24 h; b) postotak otpuštanja DOX iz PLGA-Dox u vremenu od 24 h; c) postotak otpuštanja gelatora u vremenu od 24 h.	121
Slika 59. UV-Vis spektri: ARI (lijevo) i ARIflo (desno).	122
Slika 60. UV-Vis spektar ovisnosti ARIflo o temperaturi; ARIflo ($c = 2,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) u Mili-Q vodi (zeleno – $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, crveno – na 50 °C, plavo – na 90 °C, crno – ohlađeno nazad na 25 °C).	122
Slika 61. Lijevo: fluorescencijski spektri ARI ($\lambda_{\text{exc}} = 295 \text{ nm}$; inkubacija oko 30 sek.); Desno: ekscitacijski spektri ($\lambda_{\text{em}} = 400 \text{ nm}$) u Mili-Q vodi. Slitovi 2,5 nm 2,5 nm.	123
Slika 62. Promjene UV-Vis spektara ARI ($c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, Mili-Q voda) tijekom titracije s: a) SMX; b) ovisnost promjene apsorpcije ARI na 391 nm o koncentraciji sa SMX; sjecište krivulja odgovara stehiometriji 1:1, Specfit multivarijantna nelinearna regresijska analiza daje najbolje podudaranje za ARI/SMX = 2:1 i 1:1 stehiometriju; crvene linije predstavljaju izračunato slaganje te K_{21} i K_{11} predstavljaju procijenjene konstante vezanja; c) titracija s γ -CD; d) titracija s BSA. Dodatak na c) i d): crvene linije predstavljaju nelinearno podudaranje podataka na 1:1 model kompleksa s dobivenim konstantama vezanja (K_s). Korelacijski koeficijenti za sve podatke (crvene linije) iznosi $R > 0,966$	124
Slika 63. Promjene UV-Vis spektara tijekom titracije ARI ($c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, Mili-Q voda) s α -CD (lijevo) i β -CD (desno).	125

- Slika 64. a) Promjene fluorescencijskih spektara BSA ($c = 2,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, $\lambda_{\text{exc}} = 295 \text{ nm}$) u titraciji s ARI; Ovisnost intenziteta fluorescencije BSA na $\lambda_{\text{max}} = 350 \text{ nm}$ u odnosu na $c(\text{ARI})$, pri pH 7,05, natrijev kalkodilatni pufer, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, slit 5nm, 5nm. b) Promjene u fluorescencijskom spektru ARIflo ($c = 2,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, $\lambda_{\text{exc}} = 375 \text{ nm}$) u titraciji s BSA; ovisnost emisije ARIflo na $\lambda_{\text{max}} = 401 \text{ nm}$ u odnosu na $c(\text{BSA})$, pri pH 7,05, natrijev kalkodilat pufer, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, slit 5nm, 5nm. Korelacijski koeficijenti za sve podatke (crvene linije) iznosi $R > 0,973$ 126
- Slika 65. Promjene fluorescencijskog spektra ARIflo ($c = 2,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, $\lambda_{\text{exc}} = 375 \text{ nm}$) u titraciji s SMX; Dodatno: ovisnost emisije ARIflo na $\lambda_{\text{max}} = 401 \text{ nm}$ ($\lambda_{\text{exc}} = 375 \text{ nm}$) u ovisnosti o $c(\text{SMX})$, pri pH 7,05, natrijev kalkodilat pufer, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, slit 5 nm, 10 nm. Korelacijski koeficijent za podatke (crvena linija) iznosi $R > 0,978$ 127
- Slika 66. a) mikrokolorimetrijska titracija spoja SMX ($c = 4 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) s vekuronijem (u šprici, $c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, dodan pri određenim molarnim omjerima;) u $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ fosfatnom puferu pri pH 7,0 i temperaturi $25,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$; b) kompetitivan eksperiment; mikrokolorimetrijska titracija 1:1 SMX/ARI smjese ($c = 4 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) s vekuronijem (u šprici, $c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, dodan pri određenim molarnim omjerima); točke predstavljaju eksperimentalne podatke, izračunato podudaranje za model „Jedno dominantno mjesto vezanja“ je crvena linija. 128
- Slika 67. Rokuronij u kompleksu sa SMX.¹⁶⁸ 130
- Slika 68. a) Strukture optimizirane molekularnim dokingom ARI (VdW kuglice)/SMX (štapići) kompleksa; b) molekulski dinamički optimizirana struktura u vodi, nakon 5 ns pri $T = 300 \text{ K}$, $p = 1 \text{ atm}$. Molekule vode su izostavljene radi preglednosti. 130
- Slika 69. Optimizirana niskoenergetska struktura Sugamadeksa/kompleksa aristolohijske kiseline na bazi spajanja. a) Bočni pogled na domaćin-gost kompleks koji prikazuje aristolohijsku kiselinu (štapić) unutar šupljine $\beta\text{-CD}$, pokazujući da dvije strukture imaju mnogo bliskih kontakata i međusobno su visoko komplementarne, b) Pogled odozgo prema dolje s karboksilne strane koji prikazuje CD prsten s alkilnim bočnim lancima koji sadrže karboksil koji labavo okružuju acetatnu skupinu na aristolohijskoj kiselinu (zeleno). 131
- Slika 70. Promjene UV/Vis spektara tijekom titracije ARI ($c = 2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) s ct-DNA ($c = 1,4 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) u fosfatnom puferu pH 7 pri $25,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$; $V_0 = 22,0 \text{ cm}^3$; Ovisnost apsorpcije ARI pri 330 nm o koncentraciji ct-DNA u fosfatnom puferu pH 7. 132

Slika 71. a) Promjene u fluorescencijskom spektru ARIflo (c = $2,0 \times 10^{-6}$ mol dm ⁻³ , $\lambda_{\text{exc}} = 330$ nm; vrijeme inkubacije 60 sec.) pri titraciji s ct-DNA, slit 5 nm, 5 nm; b) ovisnost ARIflo emisije pri $\lambda_{\text{max}} = 401$ nm o c(ct-DNA), podaci se podudaraju s nelinearnom regresijom prema Scatchardovoj jednadžbi pri pH 7; natrij kakodilatni pufer, $I = 0,05$ mol dm ⁻³ . Korelacijski koeficijent za sve podatke (crvena linija) iznosi $R > 0,995$	133
Slika 72. Termičke denaturacijske krivulje ct-DNA ($c(\text{ct-DNA}) = 2,0 \times 10^{-5}$ mol dm ⁻³ , $r[(\text{ARI})]/[\text{ct-DNA}] = 0,3$) pri pH 7,0 (natrij kakodilat pufer, $I = 0,05$ mol dm ⁻³) prilikom adicije ARI i ARIflo. Pogreška u ΔT_m vrijednostima: $\pm 0,5$ °C.	134
Slika 73. Promjena spektra CD ct-DNA ($c = 2 \times 10^{-5}$ mol dm ⁻³) u titraciji s ARIflo gdje je $r[(\text{ARI})]/[\text{ct-DNA}] = 0,3$ i 0,6, pri pH 7,0 (natrij kakodilat pufer, $I = 0,05$ mol dm ⁻³). Umetak: promjena signala CD krivulje pri $\lambda = 245$ nm u odnosu na omjer $r[(\text{ARI})]/[\text{ct-DNA}]$	135

POPIS TABLICA

Tablica 1. Pregled kratkih peptidnih fragmenata koji se samoorganiziraju u amiloidna vlakna. ⁸⁸	40
Tablica 2. Topljivost (g/100 mL) prirodnih ciklodekstrina (α -CD, β -CD, γ -CD, HP- β -CD). ^{150,151}	47
Tablica 3. Efikasnost geliranja različitih otapala i smjesa otapala izražena kao maksimalni volumen (V_{max}) geliranog otapala s 5 mg pripremljenih derivata tripeptida s aminokiselinskom sekvencom Ac-L-Phe-L-Phe-L-Ala.	80
Tablica 4. Efikasnost geliranja različitih otapala i smjesa otapala izražena kao maksimalni volumen (V_{max}) geliranog otapala s 5 mg pripremljenih derivata tripeptida s aminokiselinskom sekvencom Fmoc-L-Phe-L-Phe-L-Ala.	81
Tablica 5. Efikasnost geliranja različitih otapala i smjesa otapala izražena kao maksimalni volumen (V_{max}) geliranog otapala s 5 mg pripremljenih derivata tripeptida s aminokiselinskom sekvencom Ac-L-Phe-D-Phe-L-Ala.	82
Tablica 6. Efikasnost geliranja različitih otapala i smjesa otapala izražena kao maksimalni volumen (V_{max}) geliranog otapala s 5 mg pripremljenih derivata tripeptida s aminokiselinskom sekvencom Fmoc-L-Phe-D-Phe-L-Ala.	83
Tablica 7. Efikasnost geliranja pri različitim pH izražena kao maksimalni volumen (V_{max}) geliranog otapala s 5 mg gelatora Ac-FFA-NH ₂	84

Tablica 8. Vrijednosti kritične koncentracije geliranja Ac-FFA-NH ₂ u vodi uz prisutnost liposoma	85
Tablica 9. Vrijednosti kritične koncentracije geliranja Ac-FFA-NH ₂ u vodi uz prisutnost proteina BSA	85
Tablica 10. Efikasnost geliranja pri različitim koncentracijama doksorubicina izražena kao maksimalni volumen ($V_{\max}$) geliranog otapala s 2 mg gelatora Ac-FFA-NH ₂	86
Tablica 11. Efikasnost geliranja pri različitim koncentracijama doksorubicina izražena kao maksimalni volumen ($V_{\max}$) geliranog otapala s 2 mg gelatora Ac-FFA-NH ₂	87
Tablica 12. Efikasnost geliranja pri različitim koncentracijama PLGA-Dox izražena kao maksimalni volumen ($V_{\max}$) geliranog otapala s 2 mg gelatora Ac-FFA-NH ₂	87
Tablica 13. Veličina i zeta potencijal liposoma u liposomskim formulacijama	99
Tablica 14. Veličina i zeta potencijal DPPC i DMPC liposoma pripremljenih za DSC mjerenja	99
Tablica 15. Termalne karakteristike liposoma i liposomskih kompozita s Ac-FFA-NH ₂ peptidnim hidrogelatorom, iz DSC mjernih podataka.	101
Tablica 16. Vrijednosti termodinamskih parametara dobivenih ITC mjerenjima.	129

POPIS SHEMA

Shema 1. Reagensi i uvjeti: Početne komponente 1 , 2 i 5 priređene su prema opisanim procedurama ¹⁷⁶⁻¹⁷⁸ . Sinteza produkta 7 , 8 i 9 : (a) DIPEA, CH ₂ Cl ₂ , DCC, DMAP, rt, 24 h, 77 %; (b) CH ₂ Cl ₂ /TFA, 90 %; (c) EDC, HOBt, DIPEA, CH ₂ Cl ₂ , rt, 20 h, 59 %; (d) MeOH/NH ₃ , 7 dana, 96 %, (e) NaOH, 24 h, 92 %, (f) EDC, HOBt, DIPEA, CH ₂ Cl ₂ , rt, 20 h, 27 %.....	77
Shema 2. Reagensi i uvjeti: Početne komponente 2 i 5 priređene su prema opisanim procedurama ¹⁷⁶⁻¹⁷⁸ . Sinteza produkta 13 i 14 : (a) DIPEA, CH ₂ Cl ₂ , DCC, DMAP, rt, 24 h, 64 %; (b) CH ₂ Cl ₂ /TFA, 100 %; (c) EDC, HOBt, DIPEA, CH ₂ Cl ₂ , rt, 20 h, 76 %; (d) MeOH/NH ₃ , 7 dana, 86 %, (e) EDC, HOBt, DIPEA, CH ₂ Cl ₂ , rt, 20 h, 73 %.	78

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci

Ime i prezime: Nika Gazdek Serdar
Datum rođenja: 05. 07. 1994.
Mjesto rođenja: Koprivnica, Republika Hrvatska
Zvanje: Magistra primijenjene kemije

Obrazovanje

2019. – 2025. Prirodoslovno matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, doktorski studija Kemija, smjer Organska kemija
2013. - 2018. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, preddiplomski i diplomski studij Primijenjena kemija, modul: Organska kemija
Diplomski rad: „Optimiranje odziva pH osjetljivih fluoroforma u optičkim senzorima za ione“.
Mentor: izv. prof. dr. sc. Ivana Steinberg
2009. – 2013. Gimnazija „Fran Galović“, Koprivnica
2001. - 2009. OŠ „Đuro Ester“, Koprivnica

Radno iskustvo

2019. - 2025. asistent, Laboratorij za supramolekulsku kemiju, (do 2021.); Laboratorij za biomolekulske interakcije i spektroskopiju (od 2021.), Zavod za organsku kemiju i biokemiju, Institut Ruđer Bošković (IRB), Zagreb

Sudjelovanje na radionicama i tečajevima

20.-23.5.2019.	AFM workshop, Labena, Zagreb
28.1.2020.	Anton Paar seminar: Mikrovalna sinteza, Anton Paar Croatia d.o.o.
24.-28.11.2020.	Winter school of Research Commercialisation – winter school week, Fakultet farmacije i biokemije Zagreb
10.12.2020.	Step-by-step how to prepare successful paper -Croatia, AD webinars
10.6.2021.	Radionica „Odgadanje“, Bura Savjetovanje
1.7.2021.	Radionica „Mobbing“, Bura Savjetovanje
9.3.2021.	Agilent Cary 3500 Uv-Vis, AlphaChrom

Objavljeni znanstveni radovi

1. Gazdek Serdar, Nika ; Pospišil, Tihomir; Šišić, Marcela; Crnolatac, Ivo; Maleš, Petra; Frkanec, Ruža; Frkanec, Leo Self-assembled Ac-FFA-NH₂ based hydrogels with strong immunostimulating activity for vaccine delivery, *Nanoscale advances*, 7 (2025), 15; 4660-4672. doi: 10.1039/d5na00033e.
2. Gazdek, Nika, Zonjić, Iva, Nikšić-Franjić, Ivana, Frkanec, Leo, Ivo Piantanida Competitive binding of aristolochic acid between various cyclodextrins and serum albumin as a model for acute poisoning detoxification, *Supramolecular chemistry*, 33 (2022), 10; 569-577. doi: 10.1080/10610278.2022.2109472.

Stipendije

2015.-2018.	Gradska stipendija grada Koprivnice
-------------	-------------------------------------

Sudjelovanje na konferencijama

27.-29.6.2019.	Solid state Science and Research2019
19.9.2019.	Peptide chemistry day, Zagreb
3.12.2019.	Supramolchem2019, Zagreb
24.-25.4.2021.	5. PhD student symposium, Zagreb
5.-8.10.2021.	27HSKIKI, Veli Lošinj
10.12.2021.	Supramolchem2021, Zagreb
8.12.2022.	Supramolchem2022, Zagreb
28.-31.3.2023.	28HSKIKI, Rovinj

Organizacijske / rukovoditeljske sposobnosti

Ožujak - rujan 2020.	Neposredni voditelj sintetskog dijela diplomskog rada studentice Sveučilišta u Rijeci Dunje Drobac
Ožujak – rujan 2020.	Neposredni voditelj sintetskog dijela diplomskog rada studenta Sveučilišta u Rijeci Josip Moharić
Prosinac 2021.- svibanj 2022.	Neposredni voditelj spektroskopskog ispitivanja spojeva diplomskog rada studentice PBF-a Danijele Svečak
Rujan 2020.-lipanj 2023.	Neposredni voditelj stručne prakse za studente FKIT-a (Danijela Ivandić, Antonija Bikić, Doria Curiš, Marina Monika Marić, Ramona Petko)
2020.-2023.	Predstavnik asistenata u Vijeću asistenata za organsku kemiju i biokemiju Instituta Ruđer Bošković

Održana predavanja

01.06.2021.	Predavanje u sklopu Kolokvija Zavoda za organsku kemiju i biokemiju Instituta Ruđer Bošković pod naslovom: "Sposobnost nastajanja inkluzijskog kompleksa derivata ferocena s β -ciklodekstrinom".
-------------	---